

Université de Sherbrooke

MODULATION DE L'EXPRESSION DES ONCOGENES
DU VIRUS DU POLYOME ASSOCIES
A UN ILOT RICHE EN CpGs

par

Alain Renzo

Département de microbiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc)

Juillet 1989

Permission has been granted to the National Library of Canada to microfilm this thesis and to lend or sell copies of the film.

The author (copyright owner) has reserved other publication rights, and neither the thesis nor extensive extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her written permission.

L'autorisation a été accordée à la Bibliothèque nationale du Canada de microfilmer cette thèse et de prêter ou de vendre des exemplaires du film.

L'auteur (titulaire du droit d'auteur) se réserve les autres droits de publication; ni la thèse ni de longs extraits de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation écrite.

ISBN 0-315-61299-1

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	i
LISTE DES FIGURES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	iv
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	v
RESUME.....	vii
INTRODUCTION.....	1
MATERIEL ET METHODES.....	7
I. Souche virale.....	7
II. Plasmides.....	7
1. Description des plasmides.....	7
2. Méthodes de clonage.....	9
3. Mutagénèse à la nucléase Bal 31.....	10
4. Détermination des sites HpaII du HTF.....	12
III. Induction des tumeurs par injection d'ADN.....	14
IV. Etablissement de lignées cellulaires.....	14
1. Transfection de cellules en culture.....	14
2. Isolation de lignées transformées.....	16
3. Mesure du taux de réversion des lignées transformées.....	17
V. Caractérisation de l'état de méthylation de l'ADN dans les lignées transformées et révertantes.....	18
1. Extraction de l'ADN cellulaire.....	19
i. Méthode longue.....	19

ii. Méthode rapide.....	20
2. Transfert de l'ADN sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon.....	21
3. Préhybridation et hybridation.....	22
4. Préparation d'une sonde radioactive.....	23
RESULTATS.....	26
I. Effets d'un îlot HTF sur l'induction de tumeurs par injection d'ADN chez des rats nouveau-nés.....	26
II. Effets d'un îlot HTF sur la stabilité d'expression du gène T moyen.....	35
1. Effets d'un HTF en 5' du gène T moyen.....	36
2. Influences de la position et de l'orien- tation du HTF par rapport au gène T moyen..	44
3. Mutants de délétion au niveau du HTF.....	49
4. Influences de la distance entre le HTF et le gène T moyen.....	58
III. Mécanismes d'action du HTF dans le phénomène de réversion à haute fréquence.....	64
1. Instabilité de l'insert dans les lignées révertantes.....	65
2. Evidences de méthylation dans l'ADN de lignées révertantes.....	70
DISCUSSION.....	77
REMERCIEMENTS.....	83
REFERENCES.....	84
ANNEXE A.....	92

LISTE DES FIGURES

Fig. 1	Carte physique du génome du virus du polyome...	27
Fig. 2	Cartes physiques des plasmides pPA8 et pHTF-PA8	29
Fig. 3	Effets d'un HTF sur la tumorigénèse suite à l'injection d'ADN chez des rats nouveaux-nés...	31
Fig. 4	Analyse histopathologique des tumeurs induites par pHTF-PA8 et pPA8.....	33
Fig. 5	Cartes physiques des plasmides pMT3linRI et pHTF-MT.....	38
Fig. 6	Carte physique du plasmide pMT-HTFi.....	46
Fig. 7	Cartes des mutants de délétions de pHTF-MT et des principaux sites de restriction du HTF 12.15.....	51
Fig. 8	Localisation des sites HpaII dans le HTF 12.15.	52
Fig. 9	Analyse des sites HpaII dans les mutants dl 0.9 et dl 2.1.....	54
Fig. 10	Cartes physiques des plasmides pHTFdMT et pHTF2MT.....	60
Fig. 11	Analyse par Southern blot de la lignée HTF-MT/2 et des lignées révertantes R11 et R12 montrant la perte de l'insert.....	67
Fig. 12	Analyse de la méthylation dans la lignée HTF-MT/1 et la lignée révertante R1a.....	72
Fig. 13	Analyse de la méthylation dans les lignées HTF-MT/2, dMT/2 et les lignées révertantes correspondantes.....	73
Fig. 14	Analyse de la méthylation dans la lignée HTF-MT/12 et le révertant R12.....	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Effet du HTF sur l'efficacité de transformation du gène T moyen.....	40
Tableau 2	Taux de réversion au phénotype normal des lignées transformées HTF-MT et MT.....	41
Tableau 3	Taux de réversion au phénotype normal des lignées transformées pMT-HTFi.....	48
Tableau 4	Taux de réversion au phénotype normal de quelques lignées transformées par des mutants de délétion de pHTF-MT.....	56
Tableau 5	Taux de réversion au phénotype normal de lignées transformées par 2MT et dMT.....	62

LISTE DES ABBREVIATIONS

ATP	Adénosine 5' triphosphate
BSA	Albumine de sérum bovin
C	Degré Celsius
cpm	Coups par minute
CTP	Cytidine 5' triphosphate
dCTP	Désoxycytidine 5' triphosphate
ddATP	Didésoxyadénosine 5' triphosphate
dGTP	Désoxyguanosine 5' triphosphate
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylène diamine tétraacétate de sodium
EGTA	Acide éthylèneglycol-bis-(B-aminoéthyl éther) N,N,N',N' tétraacétique
g	Gramme
GTP	Guanosine 5' triphosphate
Hepes	Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2- sulfonique
kb	Kilo paires de base
M	Molaire
ml	Millilitre
N	Normale
mM	Millimolaire
mm	Millimètre

ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
^{32}P	Isotope 32 du phosphore
pb	Paire de base
Pu	Purine
Py	Pyrimidine
rpm	Rotation par minute
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
TCA	Acide trichloroacétique
Tris	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
TTP	Thymidine 5' triphosphate
U	Unité d'enzymes
μCi	Microcurie
μg	Microgramme
μl	Microlitre
μM	Micromolaire
v/v	Volume/volume

RESUME

Les îlots HTFs (HpaII Tiny Fragments) sont des séquences riches en CpGs de 500 à 2000 pb qui représentent 1% du génome total. On les retrouve fréquemment en position 5' des gènes. Nous avons mesuré l'effet d'un HTF sur l'expression des oncogènes du virus du polyome dans un essai de tumorigenèse dans des rats nouveau-nés. Nos résultats indiquent que le HTF, placé en position 5' de l'ADN viral, diminue la tumorigénécité de ce dernier et retarde l'apparition des tumeurs.

Nous avons aussi évalué l'effet d'un îlot HTF sur les événements de réversion de phénotype. Tout d'abord, nous avons observé qu'un îlot HTF, placé en 5' du gène T moyen de polyome, diminue de 5 fois l'efficacité de transformation de cellules FR3T3 par l'oncogène. Lorsque les cellules sont transformées par le gène T moyen seul, elles révertent à un phénotype non-transformé à une fréquence de 3×10^{-4} par cellule par génération. Parallèlement, des cellules transformées par le gène T moyen avec un HTF en 5' révertent à une fréquence 4 fois plus élevée, soit 1.2×10^{-3} par cellule par génération. Nous avons également observé que l'îlot HTF module l'expression du gène T moyen, indépendamment de sa position et de son orientation par rapport au gène. Nos résultats suggèrent aussi que

l'influence du HTF sur les événements de réversion à haute fréquence se manifeste même lorsqu'il est situé à une distance de 3kb des premiers codons du gène. La délétion de 12 ou 13 sites HpaII (CCGG) sur 14 du HTF inhibe son action sur la réversion. Un autre mutant possédant une délétion de 3 à 6 sites HpaII dans le HTF conserve son potentiel sur la génération d'événements de réversion à haute fréquence.

Plusieurs lignées révertantes contenant un HTF en 5' du gène T moyen perdent l'insert transfecté à haute fréquence. Cependant, ce phénomène ne semble pas être l'événement instigateur de la réversion de la majorité des lignées. Nous avons observé que quelques sites AvaI (CPyCGPuG) du HTF et/ou de T moyen étaient méthylés dans plusieurs lignées révertantes, contrairement aux sites dans les lignées transformées correspondantes. D'autre part, les lignées révertantes se retransforment aussi à un taux élevé. Ces résultats suggèrent que la méthylation du HTF serait responsable d'une bonne partie des événements de réversion à haute fréquence observés, possiblement via une inactivation transcriptionnelle du gène.

INTRODUCTION

Des travaux récents de biologie moléculaire ont établi que la régulation de l'expression des gènes chez les eukaryotes se fait à plusieurs niveaux. Les éléments de régulation identifiés jusqu'à maintenant, comme les promoteurs et les enhancers, sont des séquences d'ADN situées à proximité des gènes qui influencent la transcription suite à des interactions avec des facteurs cellulaires agissant en trans. La structure de la chromatine dans la région du gène constitue un autre mécanisme de régulation. Les arguments supportant ce mécanisme de contrôle transcriptionnel proviennent d'études analysant l'expression de groupes de gènes marqueurs introduits dans des cellules à l'aide de rétrovirus (Emerman et Temin, 1984; Mathey-Prevost et al., 1984) ou suite à des transfections (Roginski et al., 1983; Bouchard et al., 1987). La méthylation d'une région d'ADN est un mécanisme qui permet une altération stable de sa structure et ainsi de modifier l'expression de gènes dans une région donnée (Keshet et al., 1985). Dans l'ADN des mammifères, on retrouve en plus des quatre bases normales, la 5-méthylcytosine. Cette base modifiée est située surtout en 5' des guanines (Bird et Southern, 1978). Les dinucléotides CpGs sont sous-représentés par un facteur de 5 (Swartz et al., 1962; Russell et al., 1976), et 60 à 90%

de ceux-ci sont méthylés chez certains vertébrés (Gruenbaum et al., 1981; Kunnath et al., 1982; Van der Ploeg et al., 1980). Des travaux récents ont mis en évidence des îlots de CpGs non méthylés où ces dinucléotides sont 10 fois plus nombreux que dans le reste du génome (Bird et al., 1985). La rareté des CpGs dans le reste du génome s'explique par l'instabilité des cytosines méthylées. En effet, le système de réparation de l'ADN reconnaît difficilement la déamination d'une cytosine modifiée pour former une thymine (Coulondre et al., 1978; Bird, 1980). Au cours de l'évolution, ces cytosines ont ainsi muté plus fréquemment, ne laissant surtout que des îlots où les CpGs sont non-méthylés. Ces îlots sont aussi appelés HTF, pour HpaII Tiny Fragments, car on y retrouve très souvent la séquence CCGG, reconnue par l'enzyme de restriction HpaII. Cet enzyme clive l'ADN seulement si la cytosine du doublet CpG est non-méthylée. Dans l'ADN de poulet, la distance entre les sites HpaII/MspI dans la fraction HTF est de 120 pb en moyenne, comparativement à un espacement moyen de 1.8 kb dans le génome entier. De plus, la fraction HTF représente 1% du génome total (Cooper et al, 1983). Les îlots sont des séquences de 500 à 2000 pb, distantes l'une de l'autre par 100 kb en moyenne (Brown et Bird, 1986). D'après des analyses de vitesses de réassociation de brins d'ADN, il ne semble pas y avoir d'homologie de séquences entre les différents îlots (Bird et al., 1985). Sur la base de la richesse en CpGs, on a identifié plusieurs HTFs situés en 5'

de certains gènes, recouvrant souvent les premiers exons. On y retrouve en particulier des gènes ubiquitaires à toutes les cellules, la plupart encodant des enzymes métaboliques ou des protéines structurales (Gardiner-Garden et Frommer, 1987). On a d'abord identifié des îlots HTFs associés au gène de l'adénosyl phosphoribosyltransférase (APRT) du hamster chinois et à celui de la dihydrofolate réductase (DHFR) de la souris (Stein et al., 1983). Trois îlots choisis au hasard dans la fraction HTF de l'ADN de souris ne semblent pas méthylés dans plusieurs tissus comme par exemple le sperme. La plupart des gènes encodant des protéines tissus-spécifiques, pauvres en sites CpGs, sont presque'entièrement méthylés dans le sperme et les tissus n'exprimant pas la protéine. Il y aurait environ 30000 HTFs par génome haploïde dans une cellule (Bird et al., 1985). Cette valeur se rapproche du nombre de gènes par cellule, que l'on évalue entre 20 000 et 50000. Beaucoup de gènes seraient possiblement associés à des HTFs.

Un système permettant d'étudier la régulation de l'expression des gènes consiste à transfecter un gène marqueur dans des cellules en culture. A partir de cellules exprimant ce gène, on peut isoler des cellules révertantes en se basant sur le changement de phénotype. La réversion indique qu'il y a eu des modifications au niveau de l'expression du gène en question. Des cellules transfectées par le gène T moyen du virus du polyome possèdent un

phénotype transformé quand le gène est exprimé (Gélinas et Bastin, 1985; Bouchard et al., 1986). De récents travaux de notre laboratoire montrent que des cellules transfectées par un plasmide contenant le gène T moyen et exprimant ce gène, révertent à un phénotype normal avec une fréquence élevée de l'ordre de 10^{-2} - 10^{-3} par cellule par génération (Bouchard et al., 1987). Des analyses par blot de Northern et par immunoprécipitation de la protéine T moyen indiquent que ce serait la perte ou la réacquisition de l'activité transcriptionnelle du gène qui entraînerait le changement de phénotype. D'autre part, dans le même système, l'efficacité de transformation par T moyen augmente si on supprime le vecteur plasmidique lors de la transfection (L. Bouchard, communication personnelle). Les vecteurs plasmidiques sont d'origine bactérienne, donc riches en CG, et sont ainsi comparables à des îlots HTFs sur la base de leur contenu en CpGs. La méthylation des CpGs du vecteur plasmidique lié au gène T moyen inhiberait la transcription de ce dernier. Des travaux portant sur la transfection du gène APRT, associé à son propre HTF endogène, appuient cette hypothèse. Si le HTF en 5' de APRT est méthylé in vitro avant d'être transfecté, son niveau de transcription est grandement réduit (Keshet et al., 1985). Aussi, sur le chromosome X inactif, les HTFs associés aux gènes HPRT et G6PDH sont méthylés contrairement à ceux qui sont situés sur le chromosome X actif (Wolf et al., 1984a; Yen et al., 1984). Le traitement des cellules avec l'agent déméthylant 5-azacytidine permet de réactiver

des gènes sur le chromosome inactif.

L'objectif de notre travail est d'étudier la modulation de l'expression des gènes par des îlots HTFs. En premier lieu, nous avons utilisé un essai de tumorigénèse pour étudier l'effet d'un HTF sur l'expression de gènes in vivo (Gélinas et al., 1981). L'essai consiste à injecter des rats nouveau-nés avec l'ADN encodant les 3 antigènes tumoraux du virus du polyome liés ou non à un HTF, et à observer l'incidence d'apparition des tumeurs. Nous avons trouvé que lorsqu'un HTF est placé en amont de ces gènes viraux, l'ADN est beaucoup moins tumorigène et l'apparition des tumeurs est retardée fortement. En second lieu, nous avons utilisé des cellules en culture pour mieux caractériser le mode d'action des HTFs. Tout d'abord nous avons placé un HTF en 5' du gène T moyen du virus du polyome et le tout a été ensuite transfecté dans des cellules de rats en culture. Avec le HTF en 5', l'efficacité de transformation du gène T moyen diminue de 5 fois. Il est ensuite possible de déterminer le taux de réversion de cellules transformées par T moyen en utilisant le test de fluctuation de Luria et Delbruck (1943). Nous avons évalué que les cellules transformées par T moyen avec un HTF en 5' révertaient à haute fréquence (1.2×10^{-3} par cellule par génération). Cette fréquence est 4 fois supérieure à celle observée dans des cellules transformées par le gène T moyen seul, sans HTF ou vecteur plasmidique. Certains HTFs seraient situés en

3' des gènes, comme dans le cas du gène G6PDH (Toniolo et al., 1984). On a donc voulu déterminer quelle serait l'influence de la position et de l'orientation du HTF sur l'expression du gène adjacent. Nos résultats indiquent que le HTF module l'expression de T moyen indépendamment de sa position et de son orientation par rapport à ce gène. Les HTFs identifiés jusqu'à maintenant sont situés très près des gènes, chevauchant les premiers exons dans la plupart des cas (Dush et al., 1985; Dudov et Perry, 1984). Nous avons aussi tenté de mesurer quelle pouvait être la distance maximale entre le gène et le HTF de telle sorte que ce dernier exerce encore un effet sur l'expression du gène. Nos résultats montrent que le HTF influence l'expression de T moyen, et ce, même lorsqu'il est situé à 3 kb en amont du premier codon. En dernier lieu, nous avons isolé plusieurs révertants à partir de lignées transformées par le gène T moyen avec un HTF en 5'. Dans le but d'identifier le mécanisme de réversion de ces lignées, nous avons analysé l'ADN par blot de Southern. En utilisant des enzymes qui ne clivent pas si l'ADN est méthylé au niveau des CpGs, nous avons mis en évidence certains CpGs méthylés dans plusieurs des lignées révertantes.

MATERIEL ET METHODES

I. Souche virale

Dans ce travail, nous utilisons la souche A2 du virus du polyome, un variant du type sauvage produisant de grandes plaques (Fried et al, 1974).

II. Plasmides

1) Description des plasmides

pL12.15 (Bird et al., 1985) contient un fragment EcoRI de 2350 pb d'ADN eukaryotique cloné dans le vecteur pUC9 (Vieira et Messing, 1982). Cet insert renferme un îlot HTF de 1200 pb, et provient d'une banque d'ADN de sperme de souris BALB/C (Davies et al., 1980).

pMT3linRI contient le grand fragment BamHI à HindIII de l'ADN du virus du polyome cloné dans le vecteur pAT153. A la suite d'une délétion de l'intron du gène T moyen (Treisman et al., 1981), ce recombinant encode uniquement la

protéine T moyen. Il dérive du plasmide pMT3 (Asselin et al., 1983) à partir duquel nous avons inséré un adaptateur EcoRI au site BclI situé à 5021 pb dans l'ADN de polyome.

pHTF-MT contient un HTF murin en 5' de l'ADN encodant pour le gène T moyen de polyome. Il résulte de l'insertion du fragment EcoRI de pL12.15 contenant le HTF, dans l'adaptateur EcoRI de pMT3linRI. La région régulatrice des antigènes précoces de polyome est conservée entre le HTF et T moyen.

pPA8 contient le plus grand des 2 fragments HindIII du génome de polyome, cloné au site HindIII de pBR322. Ce fragment d'ADN contient l'origine de réplication ainsi que les séquences encodant les oncogènes petit T, T moyen et grand T tronqué du côté C-terminal (Bastin et al., 1980).

pHTF-PA8 contient le HTF de pL12.15 en 5' de l'ADN encodant les 3 antigènes tumoraux de polyome. La construction résulte de la ligature du petit fragment SstI de pPA8 avec le grand fragment SstI de pHTF-MT. Ceci permet d'éliminer la délétion de l'intron du gène T moyen dans pHTF-MT, et ainsi de régénérer le potentiel pour encoder les 3 antigènes précoces identiques à ceux de pPA8.

pHTFdMT provient du clonage de 2.7 kb d'ADN de cellules de rat FR3T3, au site EcoRI situé entre le HTF et le gène T

moyen dans pHTF-MT. L'insert eukaryotique a été isolé d'une banque produite à partir du vecteur pBR322. L'insert ne renferme pas de HTF puisqu'il ne contient aucun site HpaII.

pHTF2MT contient 2.0 kb d'ADN de cellules de rat FR3T3 entre le HTF et le gène T moyen. Il a été obtenu par mutagénèse à la nucléase Bal31, à partir du site unique XhoI situé dans l'insert eukaryotique de pHTFdMT.

Tous les plasmides ont été amplifiés dans la souche bactérienne E.coli HB101 (Boyer et Rouillard-Dussoix, 1969), puis purifiés à grande échelle par la méthode de lyse alcaline telle que décrite par Maniatis et al. (1982). Pour certains plasmides, l'étape de centrifugation à l'équilibre dans un gradient de chlorure de césium a été omise. Elle a été remplacée par une dialyse de 12 heures dans un tampon TE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA), suivie d'une seconde purification au phénol et au CHCl_3 , et d'une précipitation à l'éthanol telle que décrite par Maniatis et al. (1982).

2) Méthodes de clonage

L'ADN du vecteur et du plasmide contenant l'insert à cloner sont digérés par les enzymes de restriction appropriés (2 U / μg , Amersham), pendant 2 à 3 heures à 37

C dans le tampon correspondant (Amersham). Les fragments de restriction sont déposés sur un gel d'agarose 1% et, par la suite, séparés par électrophorèse dans un tampon TBE 1X (0.22 M Tris, 0.22 M acide borique, 6 mM EDTA) pendant au moins 8 heures à 30 volts. Les fragments sont extraits du gel par électroélution à l'aide de cuvettes (68-1754-010, ISCO inc.). La technique consiste à déposer la bande contenant l'ADN dans un des deux compartiments de la cuvette, au fond desquels se trouve une membrane à dialyse (132700, Spectraçpor). La cuvette contient un tampon TBE 0.2X avec 0.01% de SDS et elle trempe entre deux bains contenant du TBE 2X. Sous un courant de 10 mA, l'ADN migre dans le second compartiment, et on le prélève après 45, 75 et 105 minutes, par aliquots de 200 μ l. L'ADN est précipité par addition de 700 μ l d'isopropanol froid. La ligation est effectuée à la température de la pièce pendant 12 heures, dans un tampon de ligation (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM ATP, 1mM spermidine, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 0.1 mg /ml de BSA) contenant 4 U d'ADN ligase de T4 (Amersham), pour un volume final de 20 μ l.

3) Mutagénèse à la nucléase Bal31

La nucléase Bal31 possède une activité exonucléase sur les brins 3' ou 5' de l'ADN. Il est possible de contrôler

la digestion en variant le temps d'incubation, la concentration d'enzymes ou la concentration de NaCl. On dissout 1 µg d'ADN linéarisé dans quelques µl d'un tampon contenant 500 µg / ml de BSA, et on le préincube 3 minutes à 30 °C, dans 40 µl d'un tampon de digestion (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 12 mM CaCl₂, 12 mM MgCl₂, 200 mM NaCl, 1mM EDTA). On ajoute ensuite 2 U de nucléase Bal31 (Amersham) et la réaction est arrêtée après 2 à 10 secondes, avec 11 µl de 0.2 M EGTA et 1 volume de phénol. L'ADN est centrifugé et précipité à l'éthanol, puis resuspendu dans 44 µl d'eau distillée.

Pour augmenter l'efficacité de transformation, les extrémités de l'ADN sont comblées à la Klenow car seulement 20% des molécules générées avec la nucléase Bal31 ont des bouts francs. L'ADN est resuspendu dans un tampon Klenow (50 mM Tris-HCl (pH 7.2), 10 mM MgSO₄, 0.1 mM DTT, 50 µg /ml BSA) auquel on ajoute les nucléotides TTP, GTP, ATP et CTP à raison de 0.3 mM pour chacun, dans un volume final de 60 µl. Après l'addition de 8 U du fragment Klenow de l'ADN polymérase I de E.Coli (Amersham), la réaction se déroule pendant 20 minutes à la température de la pièce. On arrête la réaction en ajoutant un volume d'un mélange 25 : 24 : 1 de phénol (saturé en TE, 0.1% 8-hydroxyquinoline) : CHCl₃ : alcool isoamylique. Après centrifugation et précipitation de l'ADN à l'éthanol, celui-ci est resuspendu dans 16 µl d'eau distillée. La ligation est effectuée telle que

décrite dans la section " méthodes de clonage " , mais en augmentant par un facteur de deux la concentration des constituants du tampon et le volume final pour favoriser la ligation intramoléculaire.

4) Détermination des sites HpaII du HTF

Un îlot HTF contient de nombreux sites HpaII très rapprochés les uns des autres, ce qui rend la cartographie difficile. Pour palier à ce problème, il est possible d'utiliser la technique de Smith et Birnsteil (1976) modifiée par Youssaf et al. (1984), qui consiste à marquer au ^{32}P un fragment d'ADN à une extrémité et de le digérer partiellement. Chacun des fragments observés sur l'autoradiogramme correspond à un site HpaII distinct.

Le plasmide pHTF-MT a été digéré par PvuII (2 U / μg) générant ainsi 3 fragments dont le plus grand contient le HTF et le vecteur pAT153. Ces fragments sont ensuite marqués au ^{32}P aux extrémités 3' à l'aide de l'enzyme terminale transférase. Le marquage est effectué en resuspendant 30 μg d'ADN dans 30 μl d'eau distillée, volume auquel on ajoute 5 μl de tampon tdt 10X (1.4 M acide cacodylique, 1.0 M DTT et 10 mM CoCl_2) préparé le jour même, 12.5 μl de $\alpha^{32}\text{P}$ ddATP (125 μCi , PB10233,

Amersham) et 0.5 μ l H_2O . La réaction se déroule pendant 1 heure à 37 C, suite à l'addition de 20 U de terminale transférase (Amersham). La réaction est arrêtée par l'addition de 5 μ l de 0.2 M EDTA. Le volume est complété avec 200 μ l de tampon TE et 200 μ l d' un mélange 24:1 $CHCl_3$: alcool isoamylique. L'ADN est centrifugé et précipité à l'éthanol. L'ADN est digéré par BamHI (2 U / μ g), séparant alors le grand fragment PvuII en deux fragments de tailles différentes marqués à une seule extrémité. L'ADN est déposé sur un gel d' agarose 1% et séparé par électrophorèse . Ces deux fragments, l'un contenant le HTF et l'autre pAT153, sont électroélués. 10000 à 20000 cpm de chacun des fragments sont digérés partiellement par HpaII pour 30 minutes à 37 C, avec des concentrations d'enzymes allant de 0.01 à 10 U. L'ADN est déposé sur un gel d'agarose 1%, et séparé par électrophorèse durant la nuit à 30 volts dans un tampon E (40 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM acétate de sodium, 1 mM EDTA). Le gel est séché sous vide et exposé sur un film XRP-1 avec écran à -70 C.

C. Pour les mutants, on utilise une procédure semblable dans un ordre inversé. Le marquage est effectué au site BamHI, par addition de $\alpha^{32}P$ dGTP (125 μ Ci, PB10206, Amersham) à l'aide du fragment Klenow de l'ADN polymérase de E.coli (Amersham), puis l'ADN est digéré par PvuII.

III. Induction des tumeurs par injection d'ADN

Cet essai est utilisé pour mesurer le potentiel tumorigène de certains oncogènes, en injectant l'ADN chez des rats nouveau-nés. Tout d'abord, on digère 20 à 30 μg de chaque plasmide par BamHI (2 U / μg) et HindIII (2U / μg) pour éliminer le vecteur plasmidique. L'ADN est déposé sur un gel d'agarose 1%, les fragments sont séparés par électrophorèse et le fragment contenant les oncogènes est électroélué et resuspendu dans un tampon PBSA (2 mM KH_2PO_4 (pH 6.8) , 0.17 M NaCl, 3mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4). Les rats Fisher (Charles River Canada inc.), nés depuis moins de 24 heures, sont injectés par voie sous cutanée dans le cou avec 50 μl de PBSA contenant 1 μg du fragment BamHI - HindIII de 2316 pb de pPA8 ou avec 2 μg d'un fragment comparable de 4577 pb de pHTF-PA8. De cette façon, le nombre de molécules d'oncogènes injecté est identique dans les deux cas. Les animaux sont observés une fois par semaine pendant 4 à 6 mois pour noter l'apparition de nodules tumoraux.

IV. Etablissement de lignées cellulaires

1) Transfection de cellules en culture

On utilise les cellules de la lignée FR3T3 (Seif et Cuzin, 1977) provenant originaire du rat. La lignée est maintenue en culture dans le milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) auquel on ajoute 10% de sérum de veau foetal (SVF), 1% d'antibiotique (Streptomycine 0.01%, pénicilline 100 unité / ml) et 2% fongizone (2.5 µg par ml amphotérine B). Ceci constitue le milieu complet.

La technique utilisée est dérivée de celle de Stow et Wilkie (1976). L'ADN débarassé du vecteur plasmidique est resuspendu dans 25 µl de tampon TE. On ajoute à ce volume 450 µl d'ADN de thymus de veau (10 µg / ml de tampon HEBS : 20 mM Hepes (pH 7.1), 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na_2HPO_4 et 5.5 mM glucose) ou 450 µl de HEBS selon le cas, 100 µl d'aprotinine et 35 µl de 200 mM CaCl_2 . Après agitation, on laisse le précipité se former pendant 10 minutes, puis on agite à nouveau. Le contenu est versé sur un pétri de 60 mm contenant 400 000 cellules, préalablement débarrassé de son milieu. Les boîtes sont incubées pendant 30 minutes à 37 °C, en agitant légèrement à des intervalles de 10 minutes, puis 5 ml de milieu complet sans fongizone est ajouté. La fongizone est supprimée à cette étape car elle semble interférer avec la formation du précipité par la suite. Les cellules sont incubées à 37 °C pour 5 à 6 heures avec une concentration de 5% CO_2 . Ceci permet la formation d'un précipité de phosphate de calcium, nécessaire à l'incorporation de l'ADN exogène dans les

cellules. On rince ensuite une fois les cellules avec le milieu complet sans fongizone, puis on ajoute 2 ml de DMEM contenant 20% (V/V) de DMSO. Ce solvant organique perturbe quelque peu les cellules, ce qui favorise l'entrée de l'ADN vers le noyau. Après 40 secondes, les cellules sont rincées 3 fois avec du milieu complet sans fongizone pour éliminer le DMSO, toxique pour les cellules après une plus longue période. On ajoute ensuite 5 ml de milieu complet et les cellules sont incubées pendant 36 heures à 33 °C sous une atmosphère contenant 5% de CO₂. Enfin, les cellules sont trypsinisées, c'est à dire rincées avec 5 ml de versène (0.5 mM EDTA, 0.0015% de rouge de phénol dans du PBSA) et dispersées à la trypsine (0.06% dans du versène). Puis elles sont comptées à l'aide d'un hémacytomètre (Reichert) et ensemencées dans le milieu complet cette fois, à raison de 50 000 cellules par pétri de 60 mm. Les cellules sont incubées à 37 °C et le milieu changé une fois par semaine.

2) Isolation de lignées transformées

Environ 10 jours après la transfection, des foyers de cellules transformées par T moyen apparaissent sur la mosaïque de cellules FR3T3. Les cellules transformées sont plus effilées et ont un cytoplasme plus foncé, alors que les cellules FR3T3 ont un profil mieux étalé. Pour isoler un

foyer de cellules transformées, on place un anneau de métal préalablement graissé sur la zone à prélever. Après trypsinisation, les cellules sont dispersées à faible densité dans un pétri de 100 mm. On obtient alors des colonies isolées, ce qui permet de sous-cloner la lignée de façon à éviter la contamination par des cellules FR3T3 non-transformées.

3) Mesure du taux de réversion des lignées transformées

Pour évaluer le taux de réversion, on utilise une méthode inspirée du test de fluctuation de Luria et Delbruck (1943). La stratégie consiste à obtenir un certain nombre de cultures indépendantes, chacune issue d'une seule cellule de la lignée à analyser. On laisse croître chaque culture de telle sorte qu'on puisse identifier la présence de révertants dans chaque population. On évalue le taux de réversion à partir du nombre de culture dans lesquelles il n'y a pas de révertants (P_0), pour éviter la possibilité de considérer des révertants qui originent du même événement initiateur. Le nombre de mutations est donc $-\ln P_0$. D'autre part, le nombre de générations cellulaires dans une population non-synchronisée correspond à $(N_f - N_i) / \ln 2$, où N_f et N_i sont respectivement le nombre final et initial de cellules dans la culture. Pour exprimer le taux de réversion en

mutation par génération cellulaire, on utilise l'équation suivante: $-(\ln P_o . \ln 2 / N_f - N_i)$.

De façon pratique, les cellules transformées d'une lignée sous clonée sont dispersées à faible densité dans un pétri de 100 mm. On peut ensuite prélever des colonies isolées, chacune issue d'une seule cellule transformée ($N_f = 1$). Chaque colonie représentant une culture indépendante est à nouveau dispersée individuellement dans des pétris de 100 ml. Après un temps suffisant pour que les cellules forment des colonies, chacun des pétris est observé à l'aide d'une grille, pour déterminer s'il y a ou non des colonies révertantes présentes. De cette façon, chaque cellule de la colonie mère indépendante peut être identifiée d'après la morphologie de la colonie à laquelle elle a donné origine. Le nombre moyen de colonies par pétri est donc le nombre de cellules final (N_f). En appliquant l'équation ci-dessus, on obtient à, le taux de réversion de la lignée.

V. Caractérisation de l'état de méthylation de l'ADN dans les lignées transformées et révertantes.

1) Extraction de l'ADN cellulaire

i) Méthode longue

Les lignées dont on veut extraire l'ADN sont cultivées dans des pétris de 100 mm jusqu'à confluence. Le milieu est enlevé des pétris, et ils sont rincés à deux reprises avec 4 ml de tampon PBSA préalablement chauffé à 37 °C. Les cellules sont ensuite lysées par l'addition de 1 ml par pétri de tampon A (10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10mM NaCl, 10 mM EDTA et 0.5% SDS) contenant 50 µg / ml de protéinase K (Boehringer). Cette enzyme, qui agit comme inhibiteur de DNase, est préincubé 1 heure à 37 °C dans le tampon A, pour lui permettre de s'autoactiver. Les pétris sont agités doucement à température de la pièce, et après 10 minutes, les lysats de cellules sont recueillis à l'aide de policeman et versés dans un tube conique. Les tubes sont agités pendant une nuit à température de la pièce sur une roue rotative. Un volume de phénol saturé en TE, contenant 0.1% de 8-hydroxyquinoline est ajouté au lysat de cellules pour extraire les protéines du mélange. On laisse agiter 1 heure à la température de la pièce, puis le tube est centrifugé pendant 10 minutes à 3000 rpm (HB-4, Sorvall). La phase aqueuse est transférée dans un autre tube. Ces étapes sont répétées une fois avec un volume d'un mélange 25:24:1 de phénol : CHCl₃ : alcool isoamylique, puis avec un volume d'un mélange de 24 : 1 de CHCl₃ : alcool isoamylique. L'ADN ainsi purifié peut ensuite être précipité. Pour ce faire, on ajuste d'abord la concentration de NaCl de l'extrait à

400 mM. On dépose ensuite délicatement sur cette solution deux volumes d'éthanol 95% froid (-20 °C) de façon à obtenir deux phases distinctes. A l'aide d'une tige de verre, les deux phases sont mélangées de telle sorte que l'ADN précipité s'enroule autour de la tige. L'excès de sel est éliminé en trempant la tige dans l'éthanol 70% froid (-20 °C) et à nouveau dans l'éthanol à 95% pour quelques minutes. L'ADN sur la tige est séché et resuspendu dans un tube eppendorf, dans un tampon TE contenant 20 µg / ml de RNase (Boehringer), et le tout est incubé 2 heures à 37 °C. Finalement, l'ADN en solution est dialysé pendant une nuit à 4 °C dans du tampon TE. La concentration de l'ADN est évaluée par spectrophotométrie à partir de la densité optique à 260 nm, ou par fluorométrie (Hoechst, 33258).

ii) Méthode rapide

La technique est basée sur celle de Jeanpierre (1987). Suites aux rinçages avec le tampon PBSA (voir méthode longue) , on ajoute un ml par pètri de solution GASK (6 M guanidine-HCl, 0.5 M acétate d'ammonium, 1% N-lauroylsarcosinate de sodium, 200 µg / ml de protéinase K (Boehringer)). Après 10 minutes d'incubation à 37 °C, le lysat de cellules est recueilli avec un policeman et incubé pendant 2 heures à 56 °C. L'ADN est précipité sur une tige

de verre tel que décrit plus haut, mais avec de l'éthanol à la température de la pièce. L'ADN est resuspendu sans être séché dans du tampon TE contenant 20 µg / ml de RNase, et incubé 1 heure à 37 °C. Finalement, l'ADN en suspension est passé 5 fois dans une seringue (aiguille 18 G1) pour le solubiliser

- 2) Transfert de l'ADN sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon

On digère 15 à 25 µg d'ADN cellulaire avec différents enzymes de restriction. Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse sur des gels d'agarose de 1 à 1.6%, dans un tampon E pendant une nuit à 30 volts. Le gel est coloré 15 minutes dans une solution de bromure d'éthidium (2 µg / ml), et une photographie est prise sous ultra-violet pour vérifier si les digestions sont complètes. Le gel est déposé dans 200 ml d'une solution dénaturante (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) pendant 40 minutes, à la température de la pièce et avec agitation constante, pour dénaturer l'ADN. Le gel est ensuite trempé pendant 2 fois 20 minutes dans 200 ml d'une solution neutralisante (0.5 M Tris-HCl (pH 7.2), 1.5 M NaCl et 1 mM EDTA) à la température de la pièce avec agitation constante. L'ADN est transféré pendant une nuit en présence de SSC 20X (3 M NaCl, 0.3 M citrate de sodium

ajusté à un pH de 7.5 avec une solution contenant 3 M NaCl et 0.3 M acide citrique) sur une membrane de nylon (Hybond N, Amersham) ou de nitrocellulose (Hybond C, Amersham). Le montage utilisé pour le transfert est décrit par Maniatis et al. (1982). Le nylon est préalablement trempé 5 minutes dans de l'eau distillée, ou le nitrocellulose trempé pendant 10 minutes dans de l'eau distillée suivi de 20 minutes dans le SSC 20X. Après le transfert, le filtre est rincé pendant 5 minutes dans du SSC 2X. Dans le cas du nylon la membrane est séchée pendant 10 minutes à 37 C, puis l'ADN est fixé covalamment en laissant la membrane, face en dessous, sur un appareil à trans-illumination aux ultra-violet. Dans le cas du nitrocellulose, la membrane est séchée 10 minutes à la température de la pièce, puis l'ADN est fixé par cuisson sous vide à 80 C, pendant 2 heures.

3) Préhybridation et hybridation

Le filtre est incubé pendant 24 heures, avec agitation à 68 C, dans 15 ml d'une solution de préhybridation (SSC 6X, Denhardt 5X (0.1% polyvinyl pyrrolidone, 0.1% ficoll, 0.1% BSA), 0.5% SDS et 50 µg / ml d'ADN de sperme de saumon fragmenté et préalablement dénaturé 5 minutes à 100 C). Le filtre est ensuite hybridé pendant 48 heures avec agitation à 68 C, dans 5 ml de solution de préhybridation contenant

0.1 g par ml de sulfate de dextran et 7.5×10^6 cpm de la sonde radioactive, préalablement dénaturée à 37 C par l'addition de 0.1 volume de 1N NaOH. Après l'incubation, on effectue une série de lavages pour éliminer la radioactivité retenue non spécifiquement sur le filtre : deux lavages de 15 minutes dans 200 ml de la solution de préhybridation sans ADN de sperme de saumon, et un lavage dans 200 ml de SSC 2X pour 10 minutes, le tout à 68 C avec agitation. Le filtre est séché à la température de la pièce et exposé avec un film Kodak XAR-5, à - 70 C en présence d' un écran.

4) Préparation d'une sonde radioactive

Nous utilisons la méthode employant les "oligo-amorces", telle que décrite par Feinberg et Vogelstein (1983,1984) à l'aide de l'ensemble Amersham (Multiprime, RPN1601Y). Brièvement, le principe implique l'addition, sur un brin, de nucléotides marqués au ^{32}P à partir d'hexanucléotides amorces de séquences variables, sous l'action du fragment Klenow de l'ADN polymérase I de E.Coli.

Un plasmide contenant la séquence à être marquée est digéré par des enzymes de restriction de façon à libérer un fragment donné. Les fragments sont séparés par électrophorèse, dans le tampon E, sur un gel d'agarose 1%

fondant à basse température, pendant une nuit à trente volts. La bande contenant le fragment à marquer est excisée et déposée dans un tube eppendorf dans lequel on ajoute 3 ml d'eau distillée par gramme d'agarose. Le tout est chauffé à 100 °C pendant 7 minutes pour fondre le gel et dénaturer l'ADN, et ensuite aliquoté, puis entreposé à -20 °C.

Un aliquot n'est jamais utilisé plus de trois fois par la suite. Pour faire la sonde, un aliquot est rebouilli une minute et on mélange dans l'ordre : 1 à 25 µl de solution contenant 60 ng d'ADN, 10 µl de solution 1 (Amersham) contenant le tampon de réaction et les nucléotides non marqués, 5 µl de tampon 2 (Amersham) contenant les hexadéoxyribonucléotides amorces, suffisamment d'eau distillée pour compléter à un volume final de 50 µl, 5 µl de α -³²P dCTP (Amersham, PB10205, 10 µCi/µl) et 2 unités du fragment Klenow de l'ADN polymérase I de E.Coli. La réaction se déroule pendant 2 à 4 heures, temps après lequel on vérifie le taux d'incorporation des nucléotides marqués. Pour ce faire, on effectue d'abord une dilution 1 : 200 du mélange réactionnel. On compare les coups totaux contenus dans 10 µl de cette dilution avec ceux obtenus après précipitation de 10 µl de la même dilution à l'acide trichloroacétique (TCA) 10%. Pour la précipitation, 10 µl de la dilution sont déposés sur une membrane (GF/A, Whatman), et trempés 30 secondes dans le TCA 10% à 4 °C, puis la membrane est rincée sous vide avec quelques gouttes d'éthanol 95%. Le TCA va précipiter l'ADN sur le filtre

alors que les nucléotides non-incorporés vont rester en solution et être éliminés par le rinçage. Si le taux d'incorporation (cpm précipités / cpm totaux) est plus élevé que 0.5, la réaction est arrêtée en mettant le mélange à - 20 C. Sinon, la sonde est débarrassée des nucléotides non-incorporés par chromatographie sur colonne (Sephadex G - 50, Pharmacia).

RESULTATS

I. Effets d'un îlot HTF sur l'induction de tumeurs par injection d'ADN chez des rats nouveau-nés

Depuis plusieurs années, la transfection d'ADN dans des cellules eucaryotes en culture a été utilisée pour étudier les gènes et les séquences régulatrices (Wigler et al., 1977, 1979; Scangos et Ruddle, 1981). Ce système offre des avantages, comme la simplicité des manipulations et la reproductibilité des résultats, mais il comporte aussi des lacunes. Par exemple, les cellules en culture sont isolées des autres tissus et des mécanismes de contrôle de l'organisme. Il est donc avantageux dans certains cas d'utiliser un système in vivo. Cette approche a été adoptée très tôt dans l'étude de la tumorigénèse, offrant ainsi un essai rigoureux de transformation oncogénique. Par exemple, l'injection de séquences d'ADN de polyome (Py) chez des hamsters (Israel et al., 1979a,b) et chez des rats (Gélinas et al., 1981) nouveau-nés s'est avérée un excellent essai in vivo pour mesurer le potentiel oncogénique de certains gènes viraux. Le virus du polyome encode pour 3 protéines: petit T, T moyen et grand T. Les séquences de ces gènes sont chevauchantes et situées dans la partie précoce de l'ADN viral (Fig.1). En injectant l'ADN de Py à des rats nouveau-nés, des travaux de notre

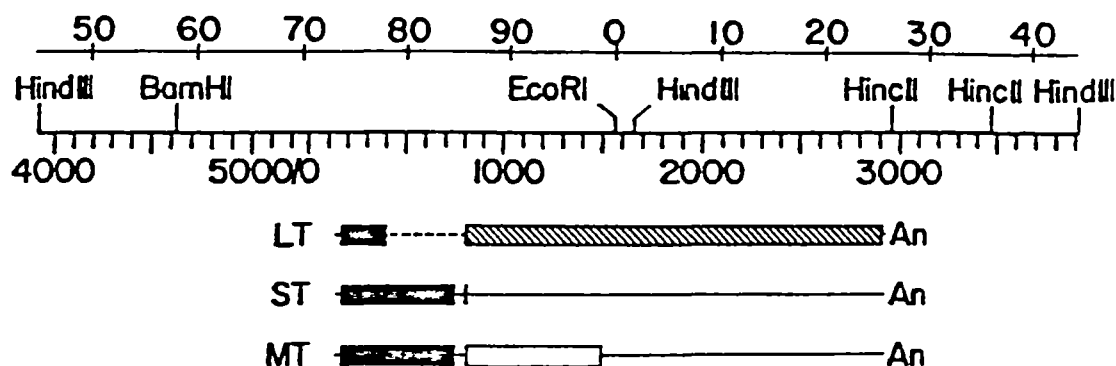


Figure 1. CARTE PHYSIQUE DU GENOME DU VIRUS DU POLYOME.

Le génome est divisé en 100 unités à partir du site unique EcoRI, et il est aussi numéroté suivant les paires de bases à partir du site HpaII situé à l'origine de répllication. L'ADN viral est linéarisé au site HindIII (nucléotide 3918) pour mettre en évidence la région précoce. Cette région produit les antigènes tumoraux petit T (ST), T moyen (MT) et grand T (LT) par épissage différentiel d'un messenger commun. Les traits pleins représentent la partie non traduite des messagers, alors que les traits pointillés correspondent aux introns. Le premier cadre de lecture commun aux trois protéines est en noir. Les seconds cadres de lectures de grand T et T moyen sont hachurés et blanc respectivement.

laboratoire ont démontré que pour induire la tumorigénèse, T moyen nécessite la coopération d'un autre oncogène, tel grand T de Py (Asselin et al., 1983). Dans cet essai, nous utilisons des rats nouveau-nés, car leur système immunitaire très peu développé favorise l'absence de rejet des tumeurs formées. Il est préférable d'injecter des quantités d'ADN supérieures à 1 µg sinon, l'incidence d'apparition des tumeurs augmente avec la quantité de matériel injectée. L'ADN doit d'abord être linéarisé, car la forme superhélicoidale n'induit que faiblement la formation de tumeurs (Israel et al., 1979a). L'injection de l'ADN de Py linéarisé induit localement le développement de liposarcomes et de fibrosarcomes. Les cellules dérivées de ces tumeurs contiennent toutes au moins une copie de la portion proximale de la région précoce du virus et expriment invariablement les protéines petit T et T moyen (Bouchard et al., 1984). Le mécanisme par lequel l'ADN pénètre dans les cellules demeure obscur. Cet essai permet néanmoins d'étudier le rôle de certaines séquences d'ADN in vivo.

Pour mesurer l'effet d'un îlot HTF sur l'expression de gènes in vivo, nous avons inséré une telle séquence en 5' de l'ADN encodant pour les 3 oncogènes de Py, dans une construction appelée pHTF-PA8 (Figure 2b). Le témoin utilisé parallèlement est pPA8 (Figure 2a), qui contient seulement l'ADN encodant les mêmes oncogènes, soit petit T, T moyen et un grand T tronqué du côté C-terminal. Dans les

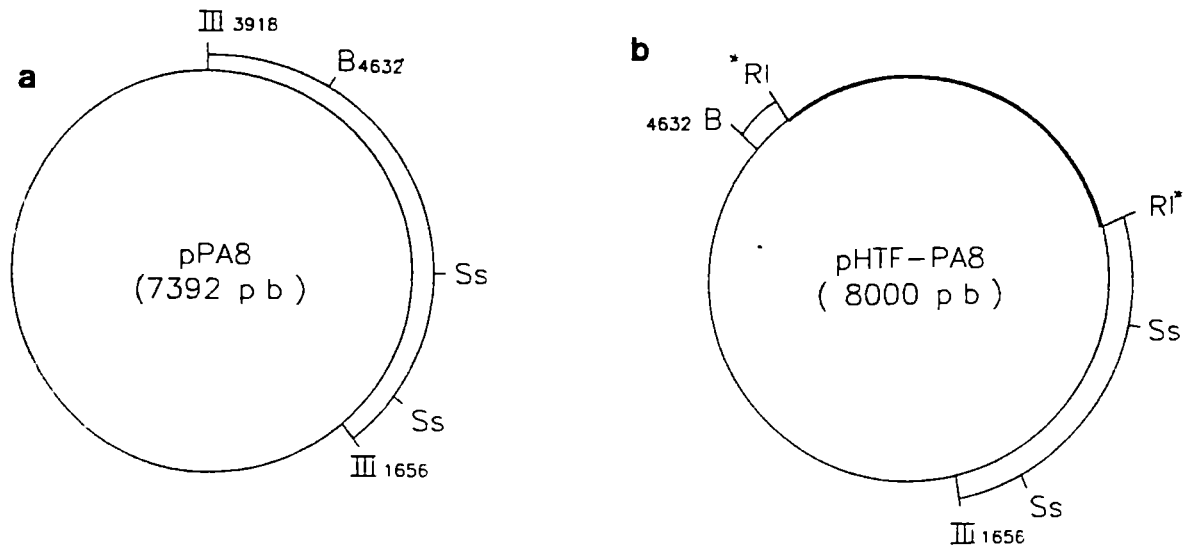


Figure 2. CARTES DES PLASMIDES pPA8 ET pHTF-PA8

(a) pPA8 contient le grand fragment HindIII de polyome (====) encodant les antigènes tumoraux petit T, T moyen et une partie de grand T. L'ADN viral est inséré dans le vecteur pBR322 (——).

(b) pHTF-PA8 renferme un îlot HTF (——) inséré au site 5021* de polyome. L'îlot est situé en 5' des trois oncogènes. La construction a été obtenue en remplaçant le petit fragment SstI de pHTF-MT par celui de pPA8. Abbréviations: B: BamHI; RI: EcoRI; III: HindIII; Ss: SstI.

2 cas, les séquences régulatrices de la région précoce de Py sont conservées. Nous avons injecté 1 ug et 2 µg des fragments BamHI-HindIII de pPA8 et pHTF-PA8 respectivement, par voie sous-cutanée dans le cou d'un certain nombre de rats nouveau-nés. L'utilisation de ces fragments, au lieu des plasmides entiers, permet d'éliminer la partie plasmidique riche en CpGs qui pourrait interférer avec l'effet du HTF. On injecte 2 fois plus du fragment BamHI-HindIII de pHTF-PA8, car il est environ 2 fois plus long. On essaie de cette façon d'injecter la même quantité de molécules par rat. Après l'injection, les animaux ont été observés une fois par semaine pendant 6 mois. Avec le fragment pPA8, il y a eu induction de tumeurs chez 66% des rats, et ce dès les premières semaines suivant les injections. Cette valeur est comparable à des résultats obtenus précédemment avec le même essai (Gélinas et al., 1981). La proportion de rats qui ont développé une tumeur au site d'injection est 2 fois moins élevée chez ceux injectés avec pHTF-PA8 que chez ceux injectés avec pPA8. De plus, la formation des tumeurs sous l'action de pHTF-PA8 est de beaucoup retardée en comparaison à celle observée avec pPA8 (Figure 3). Une simple réduction dans le taux de tumorigénèse par pHTF-PA8 pourrait laisser croire que des impuretés dans la préparation, ou même la présence du HTF, empêcherait l'ADN de pénétrer dans les cellules. Parcontre, l'observation supplémentaire d'une variation dans la vitesse d'apparition des tumeurs suggère plutôt que l'îlot altère



Figure 3. EFFETS D'UN HTF SUR LA TUMORIGENESE SUITE A L'INJECTION D'ADN CHEZ DES RATS NOUVEAUX-NES.

Le fragment BamHI-HindIII de pPA8 ou de pHTF-PA8 est injecté à des rats nouveau-nés dans un volume de 50 μ l à raison de 1 μ g et de 2 μ g respectivement. Les tumeurs apparaissent sur la nuque au site d'inoculation après quelques semaines. Le nombre de rats développant une tumeur en fonction du temps post-injection a été déterminé en observant les animaux une fois par semaine.

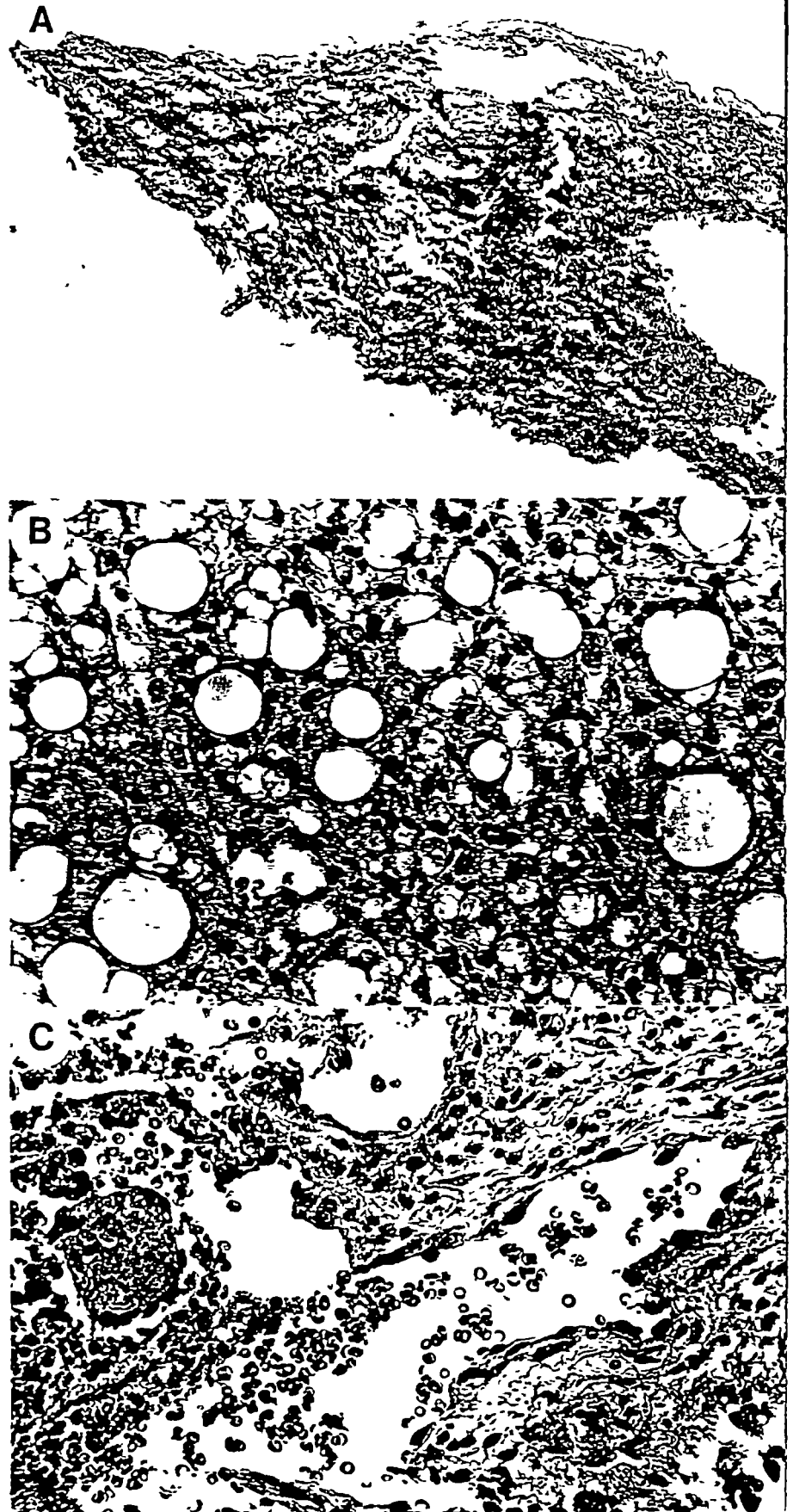
l'expression des oncogènes. Un effet inhibiteur semblable a été observé sur l'expression de gènes associés à des vecteurs plasmidiques, dans des expériences de transfections de cellules en culture (Wigler et al., 1980; L. Bouchard, communication personnelle), et d'expressions de transgènes (Chada et al., 1985; Townes et al., 1985). De plus, la coinjection de séquences de pBR322 avec pPA8 inhibe fortement la tumorigénèse. Il est important de noter que l'injection de séquences de pBR322 seulement n'induit pas de tumeurs (Bouchard et al., 1984). D'autre part, le fragment HincII de pPA8 induit des tumeurs chez 16% des rats comparativement à 60% avec le fragment HindIII (Gélinas et al., 1981). La différence entre les potentiels tumorigènes de ces deux fragments pourrait être reliée à la partie de pBR322 contenant 6 sites HpaII, qui est conservée dans le fragment HincII, contrairement au fragment HindIII qui ne contient aucune séquence plasmidique. Suite à l'examen pathologique des tumeurs, nous avons constaté que celles induites par pHTF-MT sont constituées de tissus non malin (Figure 4a). En opposition, les tumeurs induites par pPA8 sont toutes malignes de types angiosarcome ou liposarcome (Figure 4b,c). Ainsi, la présence d'une séquence riche en CpGs, tel un HTF, à proximité des oncogènes de Py semble diminuer et retarder leur expression in vivo. On peut supposer que l'îlot HTF exercerait un effet inhibiteur sur la transcription des oncogènes suite à la méthylation de certains CpGs.

Figure 4. ANALYSE HISTOPATHOLOGIQUE DES TUMEURS INDUITES PAR
pHTF-PA8 ET pPA8

A. Tissus sain, sans évidence de néoplasie maligne, obtenu suite à un prélèvement d'une masse au site d'injection de 2µg du fragment BamHI - HindIII de pHTF-PA8 (25x).

B. Tumeur maligne (liposarcome) induite par l'injection de 1 µg du fragment BamHI - HindIII de pPA8 (400x).

C. Tumeur maligne (angiosarcome) induite de façon identique à B (400x).



II. Effets d'un îlot HTF sur la stabilité d'expression du gène T moyen

On associe habituellement la modulation de l'expression des gènes, dans les cellules de mammifères, à des mécanismes modifiant la structure ou l'activité du promoteur. Les enhancers constituent un autre type d'élément de régulation situé au voisinage des gènes. Puisqu'on a identifié des îlots HTF à proximité de plusieurs gènes (Bird et al., 1986; Gardiner-Garden et Frommer, 1987), on peut imaginer que ces séquences riches en CpGs constitueraient un autre élément de contrôle utilisé par les cellules. De récents travaux supportent cette hypothèse, à partir d'analyses du gène de la thymidine kinase (TK) chez le hamster. Le HTF associé à ce gène n'est pas méthylé dans les lignées sauvages où le gène TK est exprimé, tandis qu'il est méthylé au niveau de certains CpGs dans les lignées révertantes (Dobrovic et al., 1988). D'autre part, la stabilité d'expression du gène T moyen dans des cellules de rats diffère selon que la portion plasmidique riche en CpGs est présente ou non (L.Bouchard, communication personnelle). Suite à ces observations, nous avons voulu éclaircir les rôles que pourraient exercer les HTFs sur l'expression des gènes, en particulier leurs implications dans des événements de réversion à haute fréquence. Pour caractériser des événements de réversion, il faut considérer que les populations cellulaires sont

dynamiques, et non statiques. Le taux d'apparition des révertants représente une mesure adéquate de ce phénomène, et on l'exprime en événements par génération cellulaire. Il faut connaître d'abord la fréquence, qui est une mesure de la proportion de cellules qui affichent le phénotype révertant. Il faut aussi déterminer le nombre de divisions cellulaires entre le moment où on propage un clone et celui où on dénombre les révertants. Il est nécessaire enfin d'évaluer le nombre d'événements indépendants, car les colonies révertantes observées peuvent dériver de cellules qui se sont divisées. Le test de fluctuation de Luria et Delbruck (1943) permet de tenir compte de ces paramètres. A partir de plusieurs cultures indépendantes, il permet d'évaluer le taux de réversion en considérant seulement la proportion de cultures qui ne contiennent pas de révertants. Les cultures indépendantes originent de quelques cellules d'un clone, et sont propagées jusqu'à ce qu'elles atteignent des populations finales comparables. Le nombre de cellules dans la population finale est choisi de telle sorte qu'une proportion significative de cultures ne contiennent aucun révertant. Le taux de réversion est évalué selon cette approche, décrite en détail dans la section " Matériel et Méthodes IV ".

1) Effets d'un HTF en 5' du gène T moyen

Des travaux effectués dans notre laboratoire indiquent que

des cellules transformées par le gène T moyen de Py associé à un vecteur plasmidique riche en CpG, révertent à un phénotype non transformé à haute fréquence. La réversion chez ces lignées serait associée à un blocage transcriptionnel (Bouchard et al., 1987). Il est donc intéressant d'observer l'influence d'un HTF sur les événements de réversion à haute fréquence. Dans une première étape, un HTF d'origine murine a été placé en 5' du gène T moyen de Py. Les sites HpaII de l'îlot HTF s'étendent sur 1200 pb, à l'intérieur d'un fragment d'ADN contenant 2350 pb (Voir " Résultats II.3 "). La construction pHTF-MT a été obtenue en insérant ce fragment d'ADN dans l'adaptateur EcoRI de pMT3linRI (Figure 5). Le HTF est positionné en amont du gène, car c'est à cet endroit que la plupart des HTFs ont été localisés jusqu'à maintenant (Gardiner-Garden et Frommer, 1987). L'utilisation du gène T moyen offre plusieurs avantages. Premièrement, il est facile de distinguer les cellules transformées par T moyen des cellules révertantes sur la base de leur morphologie. Les cellules transformées sont plus effilées et ont un cytoplasme plus foncé que les cellules révertantes. Ces dernières ressemblent beaucoup aux cellules FR3T3 originales. Deuxièmement, il est possible d'isoler des cellules révertantes sans appliquer de sélection par une drogue, ce qui évite de tuer les cellules d'un phénotype donné. Des cellules de rat FR3T3 ont été transfectées en utilisant la technique de précipitation au chlorure de

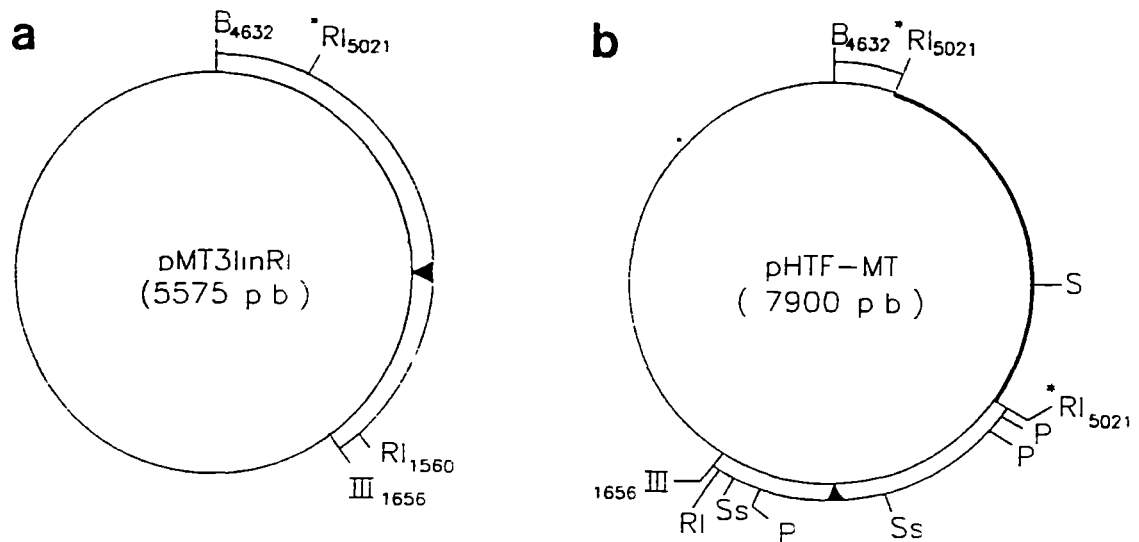


Figure 5. CARTES PHYSIQUES DES PLASMIDES pMT3-linRI ET pHTF-MT

(a) MT3linRI contient une partie de l'ADN de polyome (==) qui encode seulement la protéine T moyen. (◄) représente la délétion de l'intron de T moyen. Un adaptateur EcoRI (*) a été inséré au site BclI à 5021 pb. Le vecteur plasmidique est pAT153 (—).

(b) pHTF-MT a été obtenu en insérant un fragment d'ADN de souris (==) contenant un îlot HTF dans l'adaptateur EcoRI de pMT3linRI. L'îlot se trouve en 5' du gène encodant la protéine T moyen.

Abbréviation: B: BamHI; RI: EcoRI; III: HindIII; P: PvuII; Ss: SstI; S: SmaI;

calcium, avec 1 µg du fragment BamHI-HindIII de pMT3-linRI contenant le gène T moyen, ou avec 2 µg du fragment correspondant de pHTF-MT contenant le HTF devant le gène. On utilise une quantité deux fois plus grande du fragment de pHTF-MT, car il contient 4614 pb contrairement à 2264 pb pour MT3linRI. De cette façon, on s'assure que le nombre de molécules transfectées soit comparable dans les deux cas. En analysant les résultats de 6 transfections indépendantes, nous avons évalué l'efficacité de transformation de pMT3linRI à 35 foyers par 5×10^{-5} cellules FR3T3 (Tableau 1). La présence du HTF dans la construction diminue de 5 fois en moyenne le nombre de foyers produits. Puisque les foyers de cellules transformées apparaissent après plus de 1 semaine, on ne peut pas déterminer si l'effet du HTF se manifeste aussitôt que l'ADN pénètre dans les cellules.

Nous avons ensuite isolé plusieurs lignées indépendantes transformées soit par le gène T moyen seul, ou soit par le même gène associé cette fois avec un îlot HTF. Le taux de réversion a été déterminé pour quelques unes de ces lignées (Tableau 2). Ces lignées ont été obtenues par transfection en présence d'ADN entraîneur. Avec cette méthode, nous avons évalué que 8 lignées cellulaires sur 11 transformées par pHTF-MT révertent à une fréquence de 1.2×10^{-3} par cellule par génération. Ce taux est sensiblement inférieur à celui observé antérieurement pour des cellules transformées par le gène T moyen associé à un vecteur

TABLEAU 1.

EFFET DU HTF SUR L'EFFICACITE DE TRANSFORMATION DU GENE T MOYEN

TRANSFECTION	NOMBRE DE FOYERS / 500 000 CELLULES		RATIO
	pMT3linRI	pHTF-MT	
	(B-III) 2264 pb	(B-III) 4614 pb	
1	17	2	8.5
2	91	7	13.0
3	36	25	1.4
4	23	17	1.4
5	20	6	3.3
6	35	21	1.7

x = 4.9

1µg du fragment BamHI-HindIII (B-III) de pMT3linRI ou 2 µg du fragment B-III de pHTF-MT est transfecté dans 500 000 cellules de rats FR3T3. Après 36 heures d'incubation, les cellules sont distribuées dans 10 pétris à raison de 50 000 cellules par pétri. Le nombre de foyers provenant de 500 000 cellules est évalué après 10 jours. Le ratio est déterminé en divisant le nombre de foyers évalués pour pMT3linRI par le nombre de foyers évalués pour pHTF-MT.

TABLEAU 2.

TAUX DE REVERSION AU PHENOTYPE NORMAL DES LIGNEES TRANSFORMEES
HTF-MT ET MT

lignée cellulaire	nombre de cultures indépendantes	Nf	Po	Taux de réversion
HTF-MT1	3	402 ± 154	1/3 (0.33)	1.9 × 10 ⁻³
	7	122 ± 54	6/7 (0.14)	0.9 × 10 ⁻³
HTF-MT2	5	200 ± 46	3/5 (0.6)	1.8 × 10 ⁻³
	5	302 ± 72	3/5 (0.6)	1.2 × 10 ⁻³
HTF-MT3	5	275 ± 40	2/5 (0.4)	2.3 × 10 ⁻³
	5	409 ± 76	3/5 (0.6)	0.9 × 10 ⁻³
HTF-MT4	9	325 ± 43	4/9 (0.44)	1.8 × 10 ⁻³
HTF-MT5	8	287 ± 60	7/8 (0.88)	0.3 × 10 ⁻³
HTF-MT11	9	271 ± 47	8/9 (0.89)	0.3 × 10 ⁻³
HTF-MT12	8	282 ± 100	5/8 (0.63)	1.2 × 10 ⁻³
HTF-MT15	6	173 ± 44	4/6 (0.67)	1.6 × 10 ⁻³
	4	524 ± 92	1/4 (0.25)	1.8 × 10 ⁻³
HTF-MT16	3	360 ± 31	2/3 (0.67)	0.8 × 10 ⁻³
	7	690 ± 103	4/7 (0.57)	0.6 × 10 ⁻³
HTF-MT17	6	498 ± 60	4/6 (0.67)	0.6 × 10 ⁻³
	3	644 ± 38	2/3 (0.67)	0.4 × 10 ⁻³
HTF-MT18	4	552 ± 40	1/4 (0.25)	1.7 × 10 ⁻³
	6	307 ± 89	2/6 (0.33)	2.5 × 10 ⁻³
				$\bar{x} = 1.19 \times 10^{-3}$
MT-1	5	266 ± 67	4/5 (0.80)	0.6 × 10 ⁻³
	5	810 ± 193	5/5 (1.00)	≤ 0.2 × 10 ⁻³

lignée cellulaire	nombre de cultures indépendantes	Nf	Po	Taux de réversion
MT-2	5	422 ± 63	4/5 (0.8)	0.4 x 10 ⁻³
	4	678 ± 69	4/4 (1.0)	≤0.3 x 10 ⁻³
MT-3	6	339	5/6 (0.83)	0.4 x 10 ⁻³
MT-5	9	673 ± 164	7/9 (0.78)	0.3 x 10 ⁻³
MT-6	3	1206 ± 165	1/3 (0.33)	0.6 x 10 ⁻³
	6	522 ± 242	4/6 (0.66)	0.5 x 10 ⁻³
MT-9	8	360 ± 199	8/8 (1.0)	≤0.3 x 10 ⁻³
MT-10	8	292 ± 163	8/8 (1.0)	≤0.3 x 10 ⁻³
MT-12	10	757 ± 340	10/10 (1.0)	≤0.09 x 10 ⁻³
MT-17	9	523 ± 209	8/9 (0.89)	0.1 x 10 ⁻³
MT-21	6	614 ± 117	5/6 (0.83)	0.2 x 10 ⁻³
	4	928 ± 68	3/4 (0.75)	0.2 x 10 ⁻³
MT-22	4	713 ± 84	3/4 (0.75)	0.3 x 10 ⁻³
	4	976 ± 108	3/4 (0.75)	0.2 x 10 ⁻³
MT-23	8	522 ± 185	7/8 (0.87)	0.2 x 10 ⁻³
				$\bar{x} = 0.28 \times 10^{-3}$

Les lignées HTF-MT et MT sont obtenues en transfectant des cellules FR3T3 avec les fragments BamHI-HindIII de pHTF-MT et pMT3linRI respectivement. Les lignées sont sous-clonées et ensemencées à faible densité (5 à 10 cellules par cm²). Des colonies indépendantes de cellules transformées sont prélevées et dispersées individuellement dans des pétris de 100 mm. Les colonies résultantes ont été dénombrées et identifiées sur la base de leur morphologie. Nf représente le nombre de cellules dans une culture indépendante et Po la proportion de pétris où il n'y a aucun révertant. Le taux de réversion est évalué par l'équation $(-\ln Po. \ln 2)/Nf$, et on l'exprime en événements par génération cellulaire.

plasmidique (Bouchard et al., 1987). Les cellules transformées par le gène T moyen sans HTF ou séquence pBR322 révertent à une fréquence de 0.3×10^{-3} par cellule par génération. La présence d'un HTF devant le gène T moyen semble influencer le taux de réversion au moins par un facteur de 4. Cette différence est significative avec une valeur de $P < 0.005$ (Epreuve de Mann-Whitney)*. Les cellules transformées par le gène T moyen associé à un plasmide révertent à une fréquence 14 fois plus élevée, avec une valeur de $p < 0.0001$ (Bouchard et al., 1987). D'autre part, lorsque les lignées HTF-MT transformées vieillissent, leurs comportements varient. Nous avons mesuré le taux de réversion de deux de ces lignées après environ 50 générations supplémentaires. Cette fois, nous avons observé une fréquence de l'ordre de 0.5×10^{-3} , soit environ 2 fois moins élevée que lorsque les lignées avait 20 générations. Il est possible que la stabilité de l'ADN intégré soit à l'origine de cet écart. La fréquence de réversion serait possiblement plus élevée lorsque l'ADN transfecté n'est pas intégré stablement. Dans les lignées fraîchement isolées, l'ADN pourrait être présent dans les cellules sous forme de transgénomés ou de mini-chromosomes (Klobutcher et al., 1980). Cette hypothèse a pris forme suite à l'analyse de Southern blot de ces lignées qui montre que certaines lignées de cellules révertantes perdent l'insert à haute fréquence (Voir Résultats III). Au fil des générations, l'ADN s'intégrerait dans le génome. Nous avons

génération, l'ADN s'intégrerait dans le génome. Nous avons aussi vérifié l'influence de l'ADN entraîneur lors des transfections pour les taux de réversion de ces lignées. Les résultats obtenus indiquent que la présence d'ADN entraîneur n'influence pas de façon significative le taux de réversion des lignées transformées (HTF-MT11, 12, 15, 16, 17, et 18). Mais il demeure toujours concevable que l'ADN transfecté avec ou sans entraîneur ne soit pas intégré de façon stable initialement. En ce qui concerne les lignées HTF-MT5, 11, et 17, qui ne révertent pas à haute fréquence, il est possible que l'ADN intégré ne contienne pas de HTF complet. Elles se compareraient ainsi à des lignées MT3linRI. D'autres mécanismes inconnus pourraient aussi intervenir. Néanmoins, l'ensemble de ces résultats suggère que des séquences riches en CpGs, tel qu'un îlot HTF placé en 5' du gène T moyen, diminue la stabilité d'expression de ce dernier. La plupart des lignées révertantes HTF-MT isolées sont relativement instables, c.à.d elles se retransforment à une fréquence apparemment élevée, qui n'a pas été mesurée avec précision. La séquence réversion/retransformation spontanée à haute fréquence favorise l'hypothèse du blocage transcriptionnel par rapport aux mutations génomiques.

*Nous avons choisi cette épreuve car la distribution n'est pas normale et le nombre d'échantillons est < 30 .

- 2) Influences de la position et de l'orientation du HTF par rapport au gène T moyen

Bien que la plupart des îlots HTF identifiés jusqu'à maintenant sont localisés en 5' des gènes, il est intéressant de vérifier s'ils peuvent influencer l'expression d'un gène lorsqu'ils sont situés du côté 3'. Des travaux antérieurs ont d'ailleurs déjà identifié 2 îlots HTF en 3' du gène humain de la glucose 6-phosphate déhydrogénase (G6PD) (Toniolo et al., 1984), et un îlot en 3' du gène embryonique humain de la globine (Fishel-Ghodsian et al., 1987). Plus récemment, des îlots HTF ont été mis en évidence en 3' de plusieurs autres gènes en analysant leur contenu en G + C. Ces îlots semblent recouvrir les derniers exons plutôt que les introns, contrairement aux îlots identifiés en 5' des gènes (Gardiner-Garden et Frommer, 1987). Les enhancers sont un exemple d'éléments de régulation qui peuvent agir indépendamment de leur position et leur orientation par rapport au gène. Il pourrait en être de même pour les HTFs. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons placé un HTF en 3' du gène T moyen de Py (pMT-HTFi), où le HTF est en orientation inverse par rapport à celle dans la construction pHTF-MT (Figure 6). La construction a été obtenue en insérant au site EcoRI à 1560 pb de MT3linRI (c.à.d. 60 pb du codon de terminaison du gène T moyen), le même fragment d'ADN contenant le HTF que dans pHTF-MT. En sélectionnant pour le phénotype transformé, nous avons isolé 4 lignées par transfection de 2 µg du fragment BamHI-HindIII

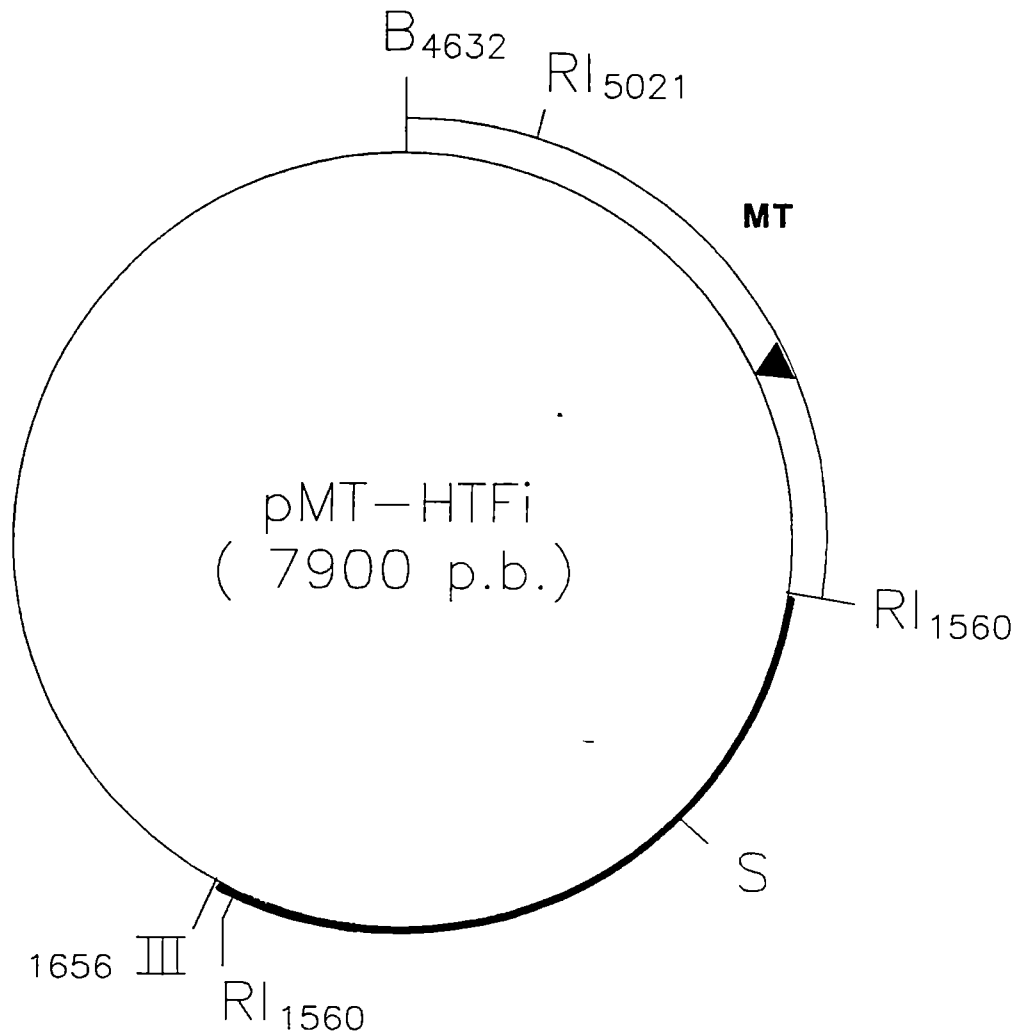


Figure 6. CARTE PHYSIQUE DU PLASMIDE pMT-HTFi.

pMT-HTFi a été obtenu en insérant un fragment d'ADN de souris (—) contenant un îlot HTF, au site EcoRI à 1560 pb de l'ADN de polyome. L'îlot se trouve en 3' du gène encodant la protéine T moyen, et en orientation inverse par rapport à celle dans pHTF-MT.

Abbreviations: B: BamHI; RI: EcoRI; III: HindIII; S: SmaI.

de pMT-HTFi dans des cellules FR3T3. Le taux de réversion a été déterminé pour chacune d'entre elles (Tableau 3). 3 des 4 lignées analysées révertent à une fréquence élevée de l'ordre de 10^{-3} par cellule par génération. Ces fréquences sont comparables à celles observées chez des lignées transformées par pHTF-MT. Face à ces résultats préliminaires, il semble que le HTF soit impliqué dans les événements de réversion à haute fréquence, indépendamment de sa position et de son orientation par rapport au gène T moyen. Dans la lignée pMT-HTFi /1, il est possible que le HTF ne se soit pas intégré, en partie ou complètement, dans le génome de la cellule. L'ADN cellulaire devrait être analysé par Southern blot pour vérifier si seulement le gène T moyen s'est intégré. Pour affirmer avec plus de certitude que l'effet du HTF se manifeste en 3' du gène, on doit tenir compte de la possibilité que plusieurs copies de pMT-HTFi se soient intégrées dans les lignées. Si tel est le cas, un HTF en 3' du gène T moyen peut être simultanément en 5' d'une autre copie du gène lorsque deux fragments sont insérés en tête à queue. Ce type de patron d'intégration a été observé précédemment dans des lignées transfectées avec le gène T moyen (Bouchard et al., 1987). La structure de l'insert dans les lignées pMT-HTFi n'a pas été analysée en détails, en terme du nombre de copies intégrées et de leurs positions relatives. Néanmoins, l'effet du HTF semble comparable autant dans les lignées transformées par pHTF-MT que dans celles transformées par pMT-HTFi. Or, il y a

TABLEAU 3.

TAUX DE REVERSION AU PHENOTYPE NORMAL DES LIGNEES TRANSFORMEES MT-HTFi

LIGNEE CELLULAIRE	NOMBRE DE CULTURES INDEPENDANTES	NOMBRE DE CULTURES SANS REVERTANTS	Po	Nf	TAUX DE REVERSION
pMT-HTFi /1	5	4	0.80	408 +/-33	0.4×10^{-3}
	5	4	0.80	557 +/-57	0.3×10^{-3}
pMT-HTFi /2	4	1	0.25	113 +/-45	6.5×10^{-3}
	5	3	0.60	226 +/-28	1.6×10^{-3}
pMT-HTFi /3	8	5	0.62	255 +/-n.d.	1.3×10^{-3}
pMT-HTFi /4	10	5	0.50	503 +/-n.d.	1.0×10^{-3}

x = 1.9×10^{-3}

Les lignées MT-HTFi ont été obtenues en transfectant le fragment BamHI-HindIII de pMT-HTFi dans des cellules FR3T3. Les lignées sont sous-clonées etensemencées à faible densité (5 à 10 cellules par cm²). Des colonies indépendantes de cellules transformées sont prélevées et dispersées individuellement dans des pétris de 100 mm. Les colonies résultantes ont été dénombrées et identifiées sur la base de leur morphologie. Nf représente le nombre de cellules dans une culture indépendante et Po la proportion de pétris où il n'y a aucun révertant. Le taux de réversion est évalué par l'équation $(-\ln P_o / \ln 2) / N_f$, et on l'exprime en événements par génération cellulaire.

statistiquement autant de chances de retrouver plus de 1 copie du fragment dans les deux cas. Ceci apporte un point en faveur de l'hypothèse du mode d'action indépendant de la position et de l'orientation du HTF. Mais d'autre part, la présence d'îlots HTF en 3' du gène de la G6PD a été remise en question très récemment, suite à la découverte de gènes en aval de chacun de ces 2 îlots (Toniolo et al., 1988). Il demeure cependant possible qu'un îlot HTF puisse moduler l'expression de plusieurs gènes dans son voisinage.

3) Mutants de délétions au niveau du HTF

Il n'existe pas d'homologie de séquences entre les différents îlots HTF, et de plus, le nombre de CpGs ainsi que la longueur varient d'un îlot à l'autre (Bird et al., 1985; Gardiner-Garden et Frommer, 1987). Puisque la caractéristique commune demeure le regroupement de dinucléotides CpGs, il est intéressant de déterminer s'il y a ou non un nombre minimal de CpGs requis pour maintenir l'effet du HTF sur l'expression du gène T moyen. La stratégie employée dans des travaux antérieurs consistait à méthyler préférentiellement certains sites CpGs in vitro, avec des méthylases bactériennes (Quint et Cedar., 1981) ou provenant du rat (Graessman et al., 1983), et de mesurer la variation de l'expression du gène adjacent. D'autres travaux utilisent plutôt des oligodéoxyribonucléotides contenant des méthylcytosines (Murray et Grosveld, 1987).

Mais avec ces approches, on conserve tous les CpGs d'un îlot, et seulement certains sont méthylés au choix de l'expérimentateur. Nous proposons ici une stratégie qui consiste à éliminer un certain nombre de CpGs dans un îlot, tout en laissant aux cellules le soin d'effectuer la méthylation *in vivo*.

Tout d'abord, il s'est avéré nécessaire d'établir une cartographie sommaire du HTF utilisé (Figure 7), car le fragment de 2350 pb qui le contient n'a pas encore été séquencé. Nous avons d'abord identifié un site SmaI (CCCGGG) unique dans la construction pHTF-MT. A l'aide de digestions totales et partielles, 4 sites AvaI (CPYCGPuG) rapprochés, dont l'un est le site SmaI, ont pu être localisés. La cartographie des sites HpaII (CCGG) a été réalisée à l'aide d'un marquage au ^{32}P d'un fragment contenant le HTF, suivi de digestions partielles par HpaII (Figure 8). La localisation des 14 sites HpaII de ce HTF correspond à celle décrite précédemment (Bird et al., 1985). Les sites HpaII sont regroupés à l'intérieur de 1200 pb et situés près de T moyen dans pHTF-MT. Ceci a permis de vérifier l'emplacement exact des sites et surtout de mettre au point une technique pour faire la cartographie des mutants de délétions de pHTF-MT. Ces mutants ont été générés en linéarisant la construction à partir du site SmaI, puis ensuite en traitant avec l'exonucléase Bal 31. Après la ligation subséquente, nous avons obtenu une banque

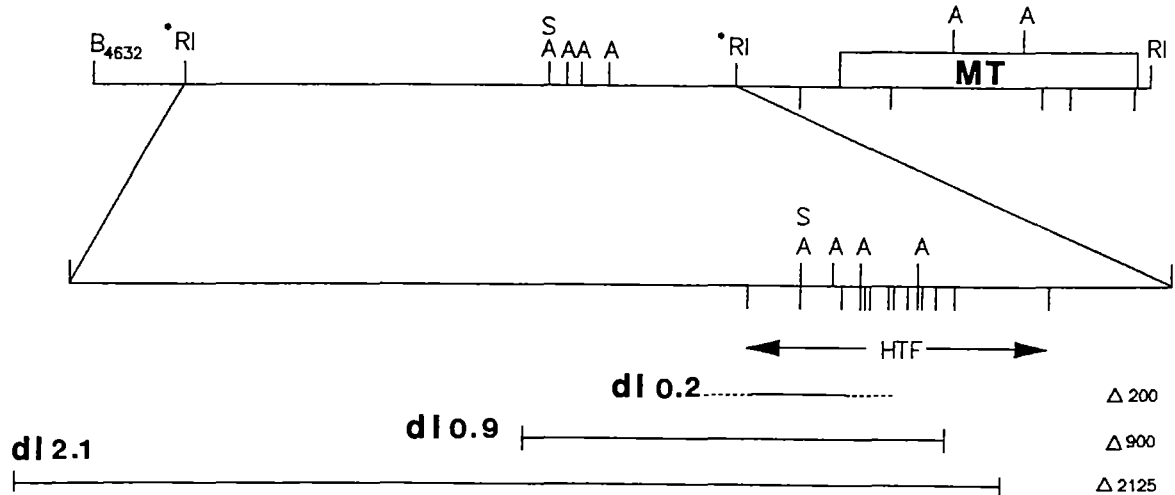


Figure 7. CARTES DES MUTANTS DE DELETION DE pHTF-MT ET DES PRINCIPAUX SITES DE RESTRICTION DU HTF 12.15

Le HTF 12.15 situé en 5' du gène T moyen contient 14 sites HpaII (traits verticaux inférieurs). Il y a aussi 4 sites AvaI (A) dont un est également un site SmaI (S). Les mutants de délétion ont été générés à l'aide de l'endonuclease Bal 31 à partir du site SmaI. Les traits pleins déterminent l'ampleur des différentes délétions et elles sont quantifiées en nombre de paires de base (Δ). Les traits interrompus indiquent l'incertitude sur les bornes exactes de ces délétions.

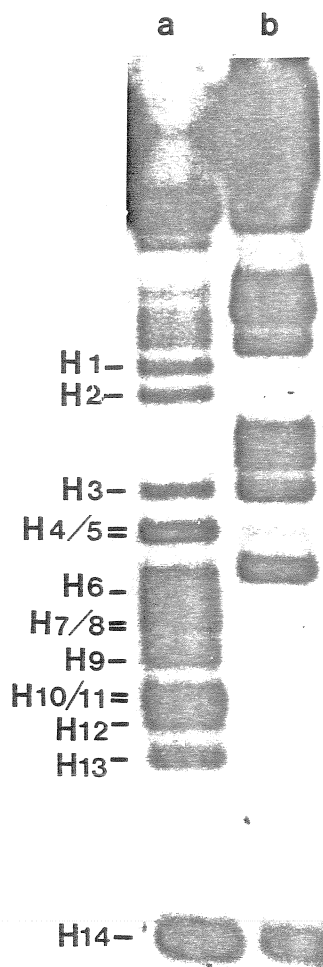


Figure 8. LOCALISATION DES SITES HpaII DANS LE HTF 12.15

Le grand fragment PvuII de pHTF-MT a été marqué au 32-P aux deux extrémités et digéré par BamHI, générant ainsi un fragment contenant le HTF (piste a) et l'autre pAT153 (piste b). Ces fragments ont été séparément digérés de façon partielle avec HpaII. Les bandes correspondent à des fragments *PvuII-HpaII de tailles différentes où chaque bande est associée à un site HpaII. Dans la piste a, on doit négliger certaines bandes qui proviennent de la contamination du fragment HTF par les fragments de pAT153. Ces derniers servent d'indicateurs de poids moléculaire. Le HTF 12.15 contient 14 sites HpaII à l'intérieur de 1200 pb (H1 à H14, ce dernier est le site le plus près de T moyen).

* Extrémité marquée.

de mutants de délétions. L'ADN de plusieurs colonies a été digéré par EcoRI et mis sur gel, pour évaluer l'ampleur des délétions. Les candidats retenus sont ceux dont le fragment EcoRI contenant le HTF (2350 pb) est délété, et dont le fragment contenant le gène T moyen (1768 pb) est intact. Deux de ces mutants, dl 2.1 et dl 0.9, contiennent respectivement 1 et 2 sites HpaII (Figure 9). Les sites les plus distants du gène T moyen ont été éliminés par les délétions respectives. Le site EcoRI entre le HTF et le site BamHI a été délété chez le mutant dl 2.1. dl 0.2 et dl 0.2x portent des délétions de 200 pb étalées de part et d'autre du site SmaI. Pour ces derniers, la cartographie n'a pas été faite, mais on peut estimer d'après la grandeur de la délétion que 3 à 6 sites ont été éliminés. Nous avons transfecté les fragments BamHI-HindIII de chacun de ces mutants, contenant un HTF délété en 5' du gène T moyen, dans des cellules FR3T3. La quantité de matériel transfecté est ajustée de façon à obtenir un nombre de molécules comparable à 1 µg du fragment de pMT3linRI, car les fragments ont des tailles différentes. Quelques lignées transformées provenant de foyers indépendants ont été isolées pour chacun des mutants. Après les avoir sous-clonées, nous avons évalué le taux de réversion de ces lignées tel que décrit dans " Matériel et Méthodes IV ". 6 des 7 lignées transformées par dl 0.9 ou dl 2.1 révertent à une fréquence inférieure à celle observée lorsque le HTF est complet. La fréquence est de l'ordre de 10^{-4} par cellule

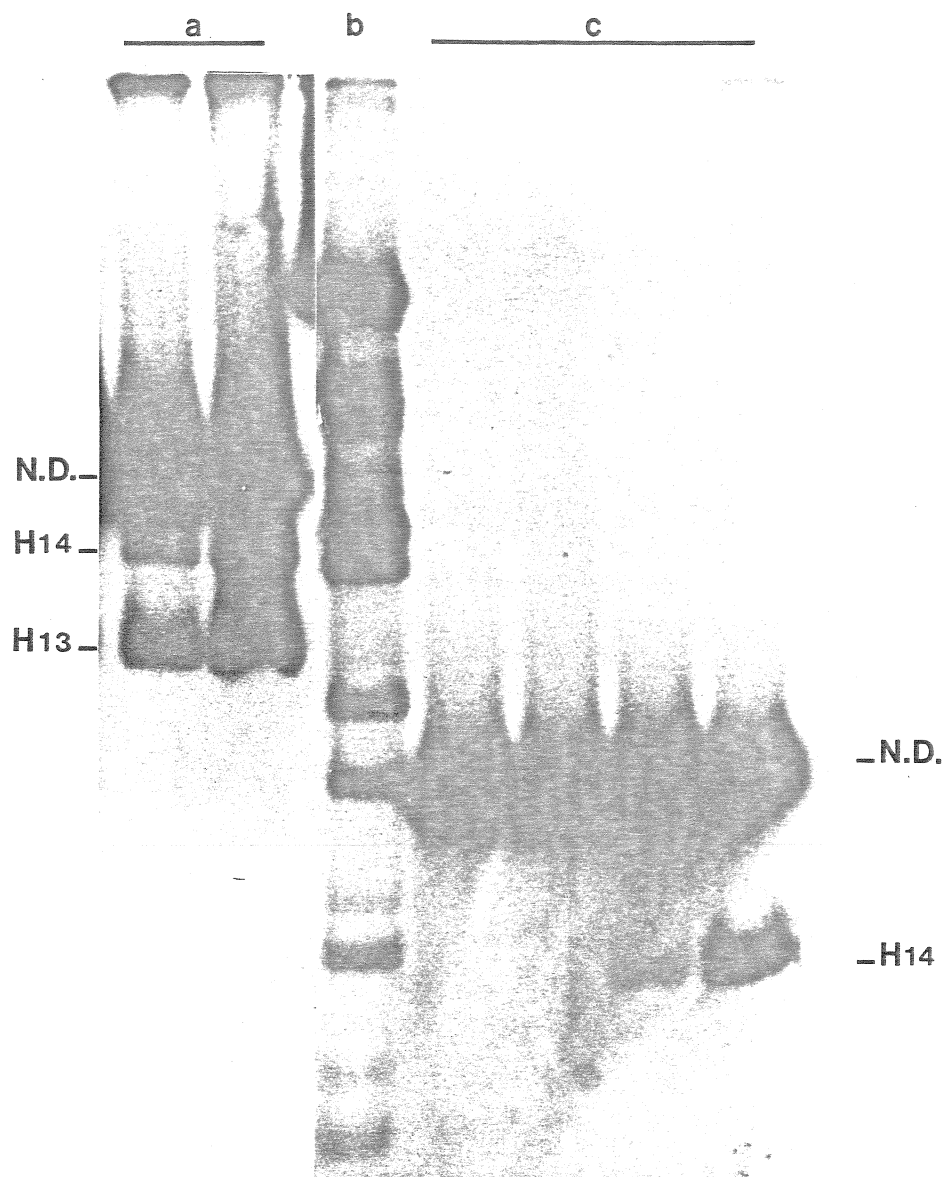


Figure 9. ANALYSE DES SITES HpaII DANS LES MUTANTS dl 0.9 ET dl 2.1

Les plasmides dl 0.9 et dl 2.1 ont été digérés au site BamHI et marqués au 32-P. La digestion par PvuII des plasmides linéarisés a généré dans chaque cas 2 fragments marqués au site BamHI, l'un contenant pAT153 et l'autre contenant le HTF portant une délétion. Chacun de ces fragments (pAT153, piste b; HTF dl 2.1, piste c, HTF dl 0.9, piste a) a été partiellement digéré par HpaII. Le nombre de fragments BamHI-HpaII correspond au nombre de sites HpaII du HTF de chaque mutant. Le mutant dl 0.9 ne contient que deux sites HpaII et dl 0.9 n'en contient qu'un seul. N.D.: non digéré.

par génération, soit comparable à celle observée pour les lignées transformées par le gène T moyen seul (Tableau 4). Cependant, il est aussi possible que ces lignées révertent à un taux intermédiaire compris entre celui des lignées HTF-MT et MT3linRI. L'analyse d'un plus grand nombre de lignées pourrait clarifier ce point. Il serait alors possible de distinguer entre des fréquences de l'ordre de 0.1×10^{-3} et 0.5×10^{-3} . Quoiqu'il en soit, la présence d'un ou deux sites HpaII du HTF semble être insuffisante pour maintenir l'influence d'un HTF complet sur l'expression du gène T moyen.

Il n'y a qu'une lignée, soit dl 0.9-3, qui réverte à une fréquence élevée. L'ADN de cette lignée a été digéré par EcoRI et analysé par Southern blot. Les filtres sont hybridés avec une sonde couvrant le fragment BamHI-HindIII transfecté ou le fragment EcoRI contenant le HTF délété. Nos analyses révèlent qu'il y a plus d'une copie intégrées dans la lignée. Trois révertants indépendants, R3, R5, et R7, ont été isolés suite à des analyses de réversion de la lignée dl 0.9-3. En analysant ces lignées révertantes par Southern blot tel que décrit pour la lignée transformée (non illustré), il semble que ces révertants perdent la totalité de l'insert à très haute fréquence (Voir Résultats III). La perte de l'insert n'est cependant pas l'événement à l'origine de la réversion, car on peut distinguer faiblement le signal des bandes de l'insert. Ceci indique que la

TABLEAU 4.

TAUX DE REVERSION AU PHENOTYPE NORMAL DE QUELQUES LIGNEES TRANSFORMEES PAR DES MUTANTS DE DELETION DE pHTF-MT

LIGNEE CELLULAIRE	NOMBRE DE CULTURES INDEPENDANTE	NOMBRE DE CULTURES SANS REVERTANTS	Po	Nf	TAUX DE REVERSION
d1 2 1 /1	5 5	5 4	1 0.80	228 +/- 70 486 +/- 60	<0.7 x 10 ⁻³ 0.3 x 10 ⁻³
d1 2 1 /3	6	6		78 +/- 25	<0.6 x 10 ⁻³
d1 2 1 /4	6	5	0.55	50 +/- 20	0.6 x 10 ⁻³
d1 0 9 /1	6 4	5 4	0.83 1	238 +/- 28 225 +/- 26	0.5 x 10 ⁻³ <0.6 x 10 ⁻³
d1 0 9 /2	8	7	0.88	171 +/- 78	0.5 x 10 ⁻³
d1 0 9 /3	10	5	0.50	150 +/- 70	0.2 x 10 ⁻³
d1 0 9 /4	6 4	6 3	1 0.75	166 +/- 56 370 +/- 68	<0.8 x 10 ⁻³ 0.5 x 10 ⁻³
d1 0 2x /1	4 4	4 4	1 1	500 +/- 40 309 +/- 71	<0.4 x 10 ⁻³ <0.6 x 10 ⁻³
d1 0 2x /2	7	7	1	506 +/- 110	<0.2 x 10 ⁻³
d1 0 2 /1	5 5	2 1	0.40 0.20	239 +/- 50 277 +/- 60	2.6 x 10 ⁻³ 2.0 x 10 ⁻³

Ces différentes lignées ont été obtenues en transfectant des cellules FR3T3 avec les fragments BamHI-HindIII des mutants de délétion de pHTF-MT. Les lignées sont sous-clonées et ensemencées à faible densité (5 à 10 cellules par cm²). Des colonies indépendantes de cellules transformées sont prélevées et dispersées individuellement dans des pétris de 100 mm. Les colonies résultantes ont été dénombrées et identifiées sur la base de leur morphologie. Nf représente le nombre de cellules dans une culture indépendante et Po la proportion de pétris où il n'y a aucun révertant. Le taux de réversion est évalué par l'équation $(-\ln P_o \cdot \ln 2) / N_f$, et on l'exprime en événements par génération cellulaire.

cellule révertante de départ portait l'insert. Cependant, l'insert n'est pas intégré de façon stable dans l'ADN génomique, et il est perdu au fil des générations. Pour expliquer le taux de réversion élevé de la lignée dl 0.9-3, il y a une possibilité que l'insert se soit intégré à proximité d'un HTF cellulaire endogène, situé dans des éléments extrachromosomiques tels les chromosomes minutes (Klobutcher et al., 1980) ou les transgènes (Schimke, 1984). En ce qui concerne les lignées transformées obtenues par transfection des fragments portant des délétions de 200pb, les lignées dl 0.2x révertent à une fréquence comparable aux lignées MT3linRI contenant seulement le gène T moyen. L'autre lignée analysée (dl 0.2) portant une délétion comparable de 3 à 6 sites HpaII, réverte à haute fréquence. Face à ces données, il est possible d'envisager plusieurs scénarios. En premier lieu, on peut considérer qu'une délétion de 3 à 6 sites HpaII ne soit pas suffisante pour altérer l'effet du HTF (lignée dl 0.2). Il est aussi possible qu'une délétion de cette ampleur soit suffisante pour inhiber complètement l'effet du HTF sur l'expression du gène T moyen (lignée dl 0.2x). Finalement, il est possible que la nature même de la délétion soit responsable des différents comportements observés. En effet, le nombre exact et le site des CpGs délétés dans les 2 cas sont probablement différents. Il est possible qu'une région contenant un ou plusieurs CpGs essentiels à la méthylation du HTF ait été délétée dans les lignées dl 0.2x. La mise en

évidence d'une corrélation entre la méthylation de CpGs spécifiques et la réversion de phénotype a été documentée récemment (Dobrovic et al., 1988), quoique cette supposition ne fait pas l'unanimité (Murray et Grosveld, 1987). On peut aussi faire l'hypothèse que les deux lignées dl 0.2x n'ont incorporé qu'une ou plusieurs copies du gène T moyen, mais sans HTF. Il est important de garder en tête que la distribution de sites HpaII ne représente qu'un reflet de la richesse en CpGs, i.e les méthylases ne méthylent pas seulement les sites HpaII. En résumé, il semblerait que l'élimination d'un certain nombre de CpGs soit suffisante pour altérer le rôle du HTF associé à des événements de réversion à haute fréquence.

4) Influences de la distance entre le HTF et le gène T moyen

La distance entre un élément de régulation et le gène sous son contrôle peut être déterminante. Par exemple, la boîte TATA retrouvée dans certains promoteurs eukaryotes a une activité optimale lorsqu'elle est située de 20 à 30 pb en avant du site d'initiation (Corden et al., 1980). Mais d'autre part, les enhancers peuvent stimuler l'expression de gènes à des distances variables allant jusqu'à plusieurs milliers de paires de bases (Khoury et Gruss, 1983). En supposant que les HTFs soient des éléments de régulations, il devient intéressant de déterminer si leur action est

influencée ou non par la distance entre l'îlot et le gène. Dans la construction pHTF-MT, le site HpaII du HTF le plus près de T moyen est situé à 0.2 kb de l'origine de réplication de polyome, près d'où se trouve le promoteur du gène. A cette distance, le HTF semble influencer la stabilité de l'expression de T moyen. Des résultats antérieurs indiquent que des lignées transformées par le gène T moyen, en amont duquel se trouvent des séquences plasmidiques riches en CpGs, révertent aussi à haute fréquence. Dans ces lignées, le premier site HpaII de la séquence plasmidique se situe à 0.7 kb de l'origine de Py (Bouchard et al., 1987). Nous avons donc entrepris une démarche, pour déterminer jusqu'à quelle distance du gène l'îlot peut manifester son effet sur la stabilité d'expression de T moyen. Deux constructions ont été conçues dans ce but, soit PHTFdMT et pHTF2MT (Figure 10). Elles contiennent l'îlot HTF séparé du gène T moyen par 2.7 et 2.0 kb d'ADN eukaryotique supplémentaire respectivement. L'ADN a été inséré au site EcoRI de pHTF-MT entre ces deux éléments. Nous avons préalablement vérifié que l'ADN inséré ne contenait aucun site HpaII. De cette façon, le dernier site HpaII du HTF se retrouve à 2.9 et 2.2 kb de l'origine de polyome dans pHTFdMT et pHTF2MT respectivement. Les fragments BamHI-ClaI de chacun de ces deux plasmides ont été transfectés dans des cellules FR3T3. On n'utilise pas les fragments BamHI-HindIII comme précédemment, car l'ADN eukaryotique utilisé à guise de séparateur contient des

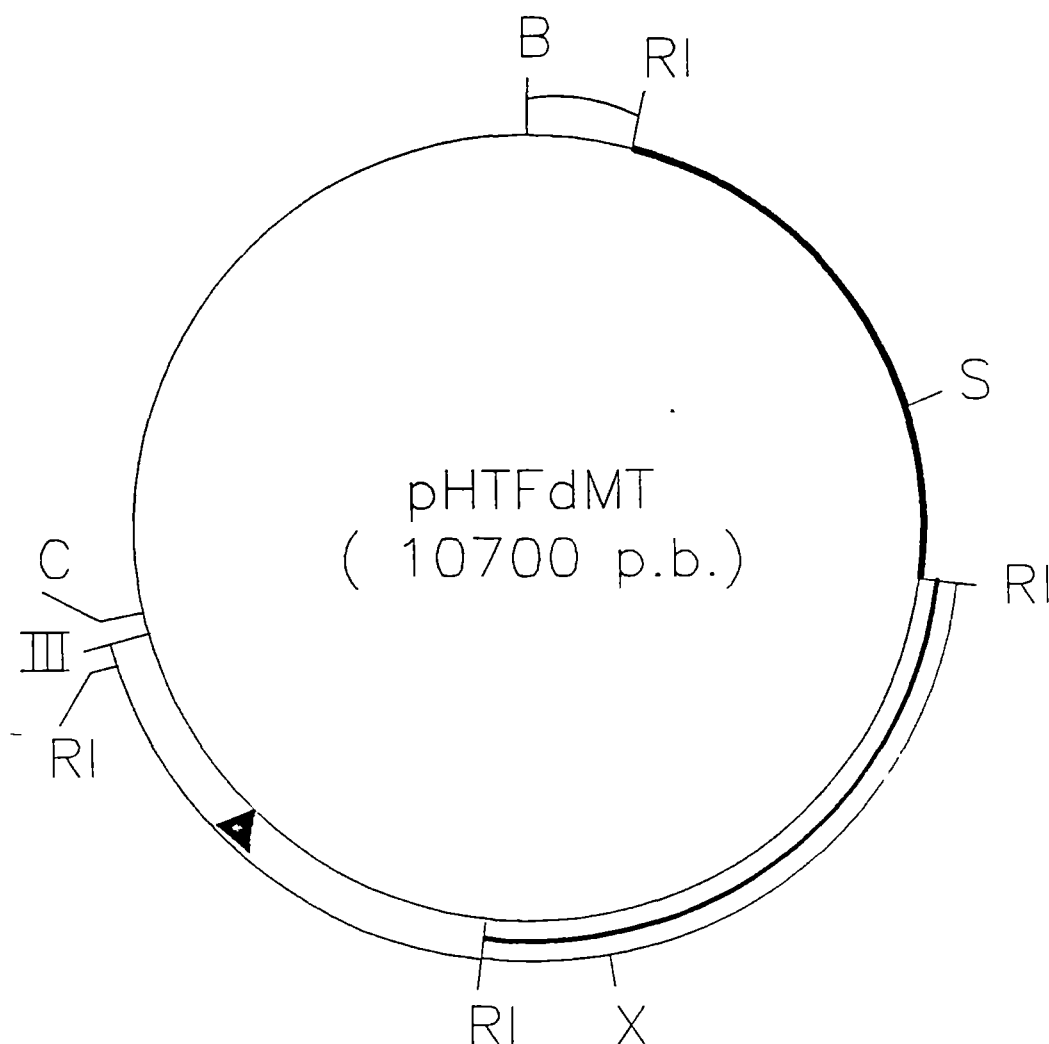


Figure 10. CARTES PHYSIQUES DES PLASMIDES pHTFdMT ET pHTF2MT

Le plasmide pHTFdMT a été obtenu en insérant 2.7 kb d'ADN eukaryotique de cellules de rats FR3T3 (≡≡≡) entre le HTF (—) et le gène T moyen (≡≡) dans pHTF-MT. Le plasmide pHTF2MT provient de pHTFdMT. Il a été généré en retranchant 0.7 kb d'ADN eukaryotique à partir du site XhoI. Abréviations: B: BamHI; C: ClaI; RI: EcoRI; III: HindIII; S: SmaI; X: XhoI.

sites HindIII mais aucun site ClaI. Des lignées transformées provenant de foyers indépendants ont été isolées suite à la transfection du fragment BamHI-ClaI de pHTF2MT (2MT) ou de pHTFdMT (dMT). Les 2 lignées dMT analysées révertent à une fréquence élevée de l'ordre de 10^{-3} par cellule par génération (Tableau 5). Ces résultats préliminaires suggèrent qu'un îlot HTF pourrait moduler l'expression du gène T moyen, même lorsqu'il se trouve à 2.9 kb de son promoteur. Cependant, les deux lignées 2MT contenant 2.2 kb d'ADN entre le HTF et T moyen révertent à une fréquence inférieure, comparable aux lignées MT3linRI sans HTF associé au gène T moyen. Et pourtant, la distance entre le HTF et le gène T moyen dans ces lignées est inférieure à celle dans les lignées dMT. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces résultats paradoxaux à première vue. Premièrement, il faut considérer que seulement 2 lignées ont été analysées pour chacun des cas. Il est possible que l'analyse de lignées 2MT supplémentaires montrerait une fréquence de réversion plus élevée. Ceci est appuyé par l'observation que la lignée 2MT /1 réverte à une fréquence plutôt intermédiaire. La lignée 2MT /2 pourrait avoir intégré un insert ne contenant pas de HTF. Une autre hypothèse implique le nombre de copies retrouvées dans les lignées dMT. Des analyses par Southern blot indiquent qu'il y a probablement 2 copies intégrées dans les lignées dMT /1 et /2 (non illustré). Un îlot HTF pourrait se retrouver très près d'une des copies du gène T

TABLEAU 5.

TAUX DE REVERSION AU PHENOTYPE NORMAL DES LIGNEES TRANSFORMEES 2MT ET dMT

LIGNEE CELLULAIRE	NOMBRE DE CULTURES INDEPENDANTES	NOMBRE DE CULTURES SANS REVERTANTS	Po	Nf	TAUX DE REVERSION
2MT /1	7	5	0.71	380 -/-110	0.6 X 10 ⁻³
2MT /2	5	4	0.80	515 -/-77	0.3 X 10 ⁻³
	4	3	0.75	725 -/-20	0.3 X 10 ⁻³
dMT /1	5	1	0.20	270 -/-50	1.1 X 10 ⁻³
	5	0	-	480 -/-76	2.3 X 10 ⁻³
dMT /2	4	1	0.25	310 -/-77	0.1 X 10 ⁻³
	5	2	0.40	55 -/-50	1.2 X 10 ⁻³

Les lignées 2MT et dMT ont été obtenues en transfectant des cellules FR3T3 avec les fragments BamHI-ClaI de pHTF2MT et pHTFdMT respectivement. Les lignées sont sous-clonées et ensemencées à faible densité (5 à 10 cellules par cm²). Des colonies indépendantes de cellules transformées sont prélevées et dispersées individuellement dans des pétris de 100 mm. Les colonies résultantes ont été dénombrées et identifiées sur la base de leur morphologie. Nf représente le nombre de cellules dans une culture indépendante et Po la proportion de pétris où il n'y a aucun révertant. Le taux de réversion est évalué par l'équation $(-\ln Po \cdot \ln 2) / Nf$, et on l'exprime en événements par génération cellulaire.

moyen et ainsi provoquer la réversion à haute fréquence. Il est possible d'envisager que le taux élevé de réversion des lignées dMT soit attribuable à d'autres circonstances inconnues. On peut cependant suggérer, face à l'ensemble de ces données, que des séquences riches en CpGs comme les HTFs peuvent moduler à distance l'expression du gène T moyen. La distance maximale ne peut être déterminée à l'aide de ces résultats préliminaires, mais il semble que l'effet puisse être observé au moins à une distance de 0.7 kb. Il reste à vérifier si le HTF peut vraiment moduler l'expression du gène T moyen situé à 2.9 kb. Ces résultats apportent donc une autre dimension quand à l'effet à distance possible des HTFs sur les gènes.

III. Mécanismes d'action du HTF dans le phénomène de réversion à haute fréquence

De façon générale, on décrit un événement de réversion, dans une population cellulaire, comme étant le passage d'un phénotype acquis au phénotype original. Les mécanismes de réversion sont variés et peuvent agir sur différentes fonctions cellulaires. Par exemple, la réversion est souvent associée à des modifications au niveau de l'ADN. Dans ce cas, l'altération de l'expression d'un ou plusieurs gènes impliqués dans la manifestation du phénotype peut être causé par divers types de mutations (Calos et al., 1983; Razzaque et al., 1983). La fréquence de ces événements de mutation est de l'ordre de 10^{-6} par génération cellulaire. La réversion peut aussi être reliée à des mécanismes inhibant la transcription ou la traduction. Contrairement à ces modifications de nature génétique, il est possible que le mode d'action des HTFs soit plutôt relié à des événements épigénétiques, plus particulièrement la méthylation de CpGs. Les CpGs de l'îlot ne sont normalement pas méthylés. Plusieurs travaux supportent l'idée qu'un îlot HTF pourrait devenir méthylé sous certaines conditions (Wolf et al, 1984a,b; Keshet et al., 1985). La fréquence de réversion que nous avons observée pour les lignées pHTF-MT est environ 1000 fois plus élevée que dans le cas d'événement de nature génétique. C'est à cette ordre de fréquence qu'on associe les événements

épigénétiques (Siminovitch, 1976). Nous avons voulu ainsi vérifier si les événements de réversion à haute fréquence seraient causés par la méthylation de l'îlot HTF adjacent. A cette fin, il existe des enzymes tels HpaII, AvaI, ou SmaI, qui ne clivent pas l'ADN si le CpG est méthylé au site de reconnaissance de l'enzyme. La stratégie consiste d'abord à isoler l'ADN de lignées transformées et révertantes correspondantes. Ensuite, on compare le patron de digestion par un de ces enzymes à l'aide de Southern Blot avec une sonde appropriée.

1) Instabilité de l'insert dans les lignées révertantes

Habituellement, lorsque des cellules en culture sont transfectées avec la technique utilisant le chlorure de calcium, on croit que l'ADN exogène s'intègre de façon stable. Dans la plupart des cas, la sélection à l'aide d'une drogue comme l'hygromycine ou la néomycine permet de conserver seulement les cellules qui ont intégré et expriment le gène de résistance. Dans le système utilisé dans ce travail, nous n'utilisons pas de gène de résistance. Les colonies exprimant le gène T moyen ont un phénotype transformé, et peuvent être isolées des cellules FR3T3 sans sélection. Lors de l'analyse des taux de réversion (Résultats II), 20 lignées pHTF-MT révertantes ont été isolées à partir de 6 lignées transformées, en se basant sur leur phénotype non transformé comparable aux cellules

FR3T3. Après avoir extrait l'ADN, il a été digéré par EcoRI et analysé par Southern blot. La figure 11 (piste a) montre un patron typique de restriction d'une lignée contenant un seul insert pHTF-MT. Les lignées transformées contiennent 1 à 3 copies d'ADN. Les fragments de 1.7 et 2.4 kb correspondent au gène T moyen et au HTF 12.15 respectivement. Un troisième fragment de 3.4 kb, qui hybride avec le HTF 12.15 de souris, a été retrouvé dans toutes les cellules dérivées de FR3T3. Cette bande correspond à l'équivalent chez le rat du HTF 12.15 de souris. Plusieurs extractions de lignées pHTF-MT révertantes ont été effectuées à des intervalles de temps différents. Au fil des générations, nous avons observé une diminution de l'intensité du signal de l'insert dans la moitié des lignées, soit 10 sur 20 (Figure 11, piste b,c). Nous supposons que le HTF et le gène T moyen ne se sont pas intégrés de façon stable dans ces lignées. On entend par stable, l'intégration dans l'ADN chromosomique de telle sorte que l'insert est dupliqué à chaque division cellulaire. 8 lignées sur 20 conservent les fragments de 1.7 et de 2.4 kb sans perte d'intensité notable, et 2 lignées sur 20 semblent complètement perdre l'insert après 27 à 30 générations cellulaires. Il est peu probable d'envisager que l'instabilité de l'insert soit à l'origine de la réversion, du moins dans 18 des 20 lignées. La perte de l'insert ne semble pas être l'événement initiateur de la réversion dans ces lignées, puisque le signal de l'insert

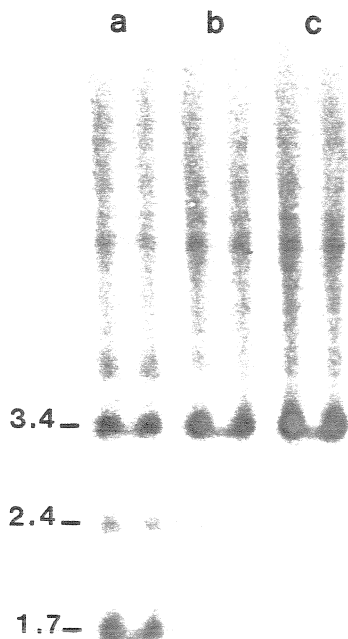


Figure 11. ANALYSE PAR SOUTHERN BLOT DE LA LIGNEE HTF-MT /2 ET DES LIGNEES REVERTANTES R11 ET R12 MONTRANT LA PERTE DE L'INSERT

20 µg d'ADN cellulaire ont été digérés par l'enzyme EcoRI. Les fragments sont ensuite séparés sur gel d'agarose 1.2%, transférés sur nylon et hybridés avec une sonde radioactive (fragment BamHI-HindIII de pHTF-MT) contenant le HTF et T moyen. Les deux lignées révertantes montrent un signal de l'insert plus faible (1.7 et 2.4 kb).

HTF cellulaire	: 3.4 kb
HTF12.15	: 2.4 "
T moyen	: 1.7 "

piste a : lignée transformée HTF-MT /2
 piste b : lignée révertante R11
 piste c : lignée révertante R12

est identique à la lignée transformée (8/20) ou plus faible (10/20). Si tel était le cas, la première cellule révertante n'aurait pas d'insert, tout comme les cellules qui en dérivent. Une hypothèse expliquant cette instabilité serait que l'ADN transfecté est intégré dans des unités extrachromosomiques (Scangos et al., 1979). Ces éléments ne sont pas nécessairement ségrégués à chaque division cellulaire. Et puisque qu'aucune sélection n'est appliquée, il est impossible de discriminer entre une cellule révertante portant l'insert et une autre qui l'a perdue. En ce qui concerne les lignées transformées, il est possible de distinguer entre une cellule qui exprime T moyen et une cellule qui a perdu l'insert. Cette dernière possède un phénotype normal. Mais puisque le taux de croissance des cellules transformées est de beaucoup supérieur, il devient difficile d'observer des cellules sans insert parmi elles. Il est aussi possible que les cellules transformées perdent l'insert à une fréquence élevée. Cependant, parmi les 20 lignées révertantes analysées, 2 d'entre elles seulement pourraient avoir réverté suite à une perte de l'insert. Cette observation suggère que la réversion au phénotype normal précède dans la majorité des cas la perte de l'insert dans notre système.

Nous avons développé une équation mathématique qui décrit à quelle fréquence les lignées révertantes perdent l'insert (Annexe. A). L'équation finale se résume à $F(n) = 1 /$

$2np$, où F est le rapport entre le nombre de cellules qui ont gardé l'insert et le nombre total de cellules à un moment déterminé. F est une fonction du nombre de générations n , et p est la fréquence de perte de l'insert que l'on veut déterminer. Pour évaluer F , on compare l'intensité du signal sur Southern blot de l'insert chez la lignée révertante (G) et d'un fragment HTFc (H). Ce dernier est présent à raison d'une copie par cellule. Le ratio G/H correspond à F , car l'intensité de G et H est proportionnelle au nombre de cellules qui contiennent l'insert ou le fragment cellulaire respectivement. On détermine n tout simplement en comptabilisant le nombre de passages que la lignée a subi dans des contenants de tailles connues. La seule inconnue demeure p . Dans le cas de la lignée révertante pHTF-MT /1 R1, nous avons évalué p à 2×10^{-1} . Des travaux antérieurs sur les transformants instables suggèrent que jusqu'à 10% des cellules peuvent perdre le gène transfecté à chaque génération (Scangos et al., 1981). Cette fréquence incroyablement élevée suggère qu'à chaque fois que 5 cellules se divisent, l'une d'elle ne ségrègue pas l'insert. Il devient alors difficile d'analyser la méthylation de l'insert lorsque les cellules le perdent à une telle fréquence. En supposant que l'évaluation de la fréquence est bonne pour les lignées révertantes, il est fort probable que les lignées transformées ne perdent pas l'insert à cette fréquence. Car la majorité des révertants qu'on isolerait serait relié à

l'instabilité de l'insert.

2) Evidences de méthylation dans l'ADN de lignées révertantes

Pour contourner le problème de la perte de l'insert à haute fréquence, nous avons dû faire appel à une autre technique d'extraction (Matériel et Méthodes IV). Celle-ci est plus rapide, mais surtout permet d'extraire efficacement l'ADN d'un petit nombre de cellules. De cette façon, les cellules ont subi moins de divisions, et une plus grande proportion d'entre elles ont gardé l'insert. Le rendement de la technique est important, car la petite taille des fragments hybridés sur les filtres requiert au moins 15 µg d'ADN par piste. La méthode longue ne permet pas d'extraire l'ADN de quelques millions de cellules avec un bon rendement.

Dans le but de déterminer si la méthylation de certains sites CpGs était responsable de l'inactivation transcriptionnelle du gène T moyen, nous avons analysé l'ADN de plusieurs lignées révertantes. L'ADN a été digéré à l'aide des enzymes EcoRI et AvaI. L'enzyme AvaI, sensible à la méthylation, clive à 4 endroits dans le HTF (A1, A2, A3 et A4) et à 2 autres dans T moyen, soit A5 et A6 (Figure 7). Nous avons choisi cet enzyme au lieu de HpaII, car les sites de restriction sont moins nombreux. Ceci rend

l'analyse des Southern blot moins compliquée. La digestion de l'ADN par EcoRI et AvaI devrait donner 8 fragments lorsque les doublets CpGs des sites AvaI ne sont pas méthylés. Cependant les fragments de taille inférieure à 150 pb (A1 à A4) sont difficilement détectables avec la technique de blot génomique utilisée. Heureusement, la localisation de fragments de taille supérieure constitue une méthode adéquate pour reconnaître la présence de méthylation à certains sites.

Voici la description d'analyses typiques de quelques patrons de méthylation. Dans le cas de la lignée pHTF-MT/1 et du révertant R1a, la présence des fragments de 544, 928 et 1550 pb indique que les sites A1, A5 et A6 ne sont pas méthylés dans la lignée transformée et dans la lignée révertante (Figure 12). Nous pouvons distinguer le fragment de 544pb de T moyen du fragment de 550pb du HTF en réhybridant le filtre avec une sonde recouvrant la partie virale entre les deux sites EcoRI. Cette lignée a réverté suite à la méthylation de sites non analysés où à l'aide d'un mécanisme différent. L'analyse de 2 autres révertants R11 et R12 provenant d'une autre lignée est légèrement compliquée par le phénomène de la perte de l'insert (Voir Resultat III.1). L'absence des fragments de 544 et 928 pb indique que les sites A5 et A6 dans le gène T moyen sont méthylés (Figure 13, b et c). De plus, un fragment de 640 pb remplace le fragment à 550 pb du HTF, ce qui indique que

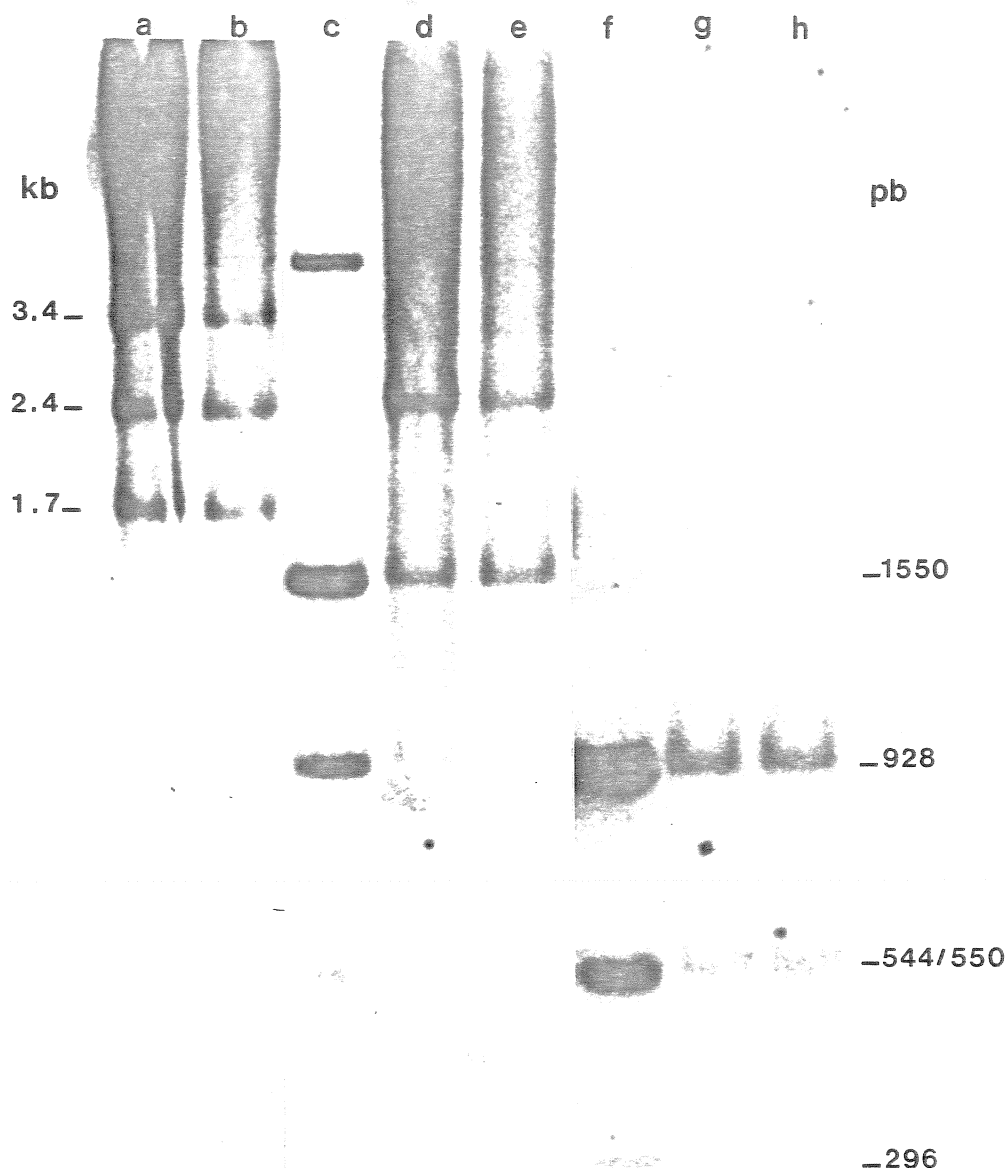


Figure 12. ANALYSE DE LA METHYLATION DANS LA LIGNEE HTF-MT /1 ET LA LIGNEE REVERTANTE R1a

20 µg d'ADN cellulaire ont été digérés par EcoRI (piste a,b) ou par EcoRI et AvaI (piste d,e,g,h). Le marqueur plasmidique pHTF-MT a été digéré par EcoRI et AvaI (piste c,f). Les fragments sont séparés sur gel d'agarose 1.2%, transférés sur nylon et hybridés avec une sonde radioactive couvrant le HTF et T moyen (a-e) puis réhybridés avec une autre sonde couvrant T moyen seul (f-h).

piste a:	R1a	/	EcoRI	
piste b:	HTF-MT /1	/	"	
piste c,f:	pHTF-MT	/	"	
piste d,g:	R1a	/	"	et AvaI
piste e,h:	HTF-MT /1	/	"	et "

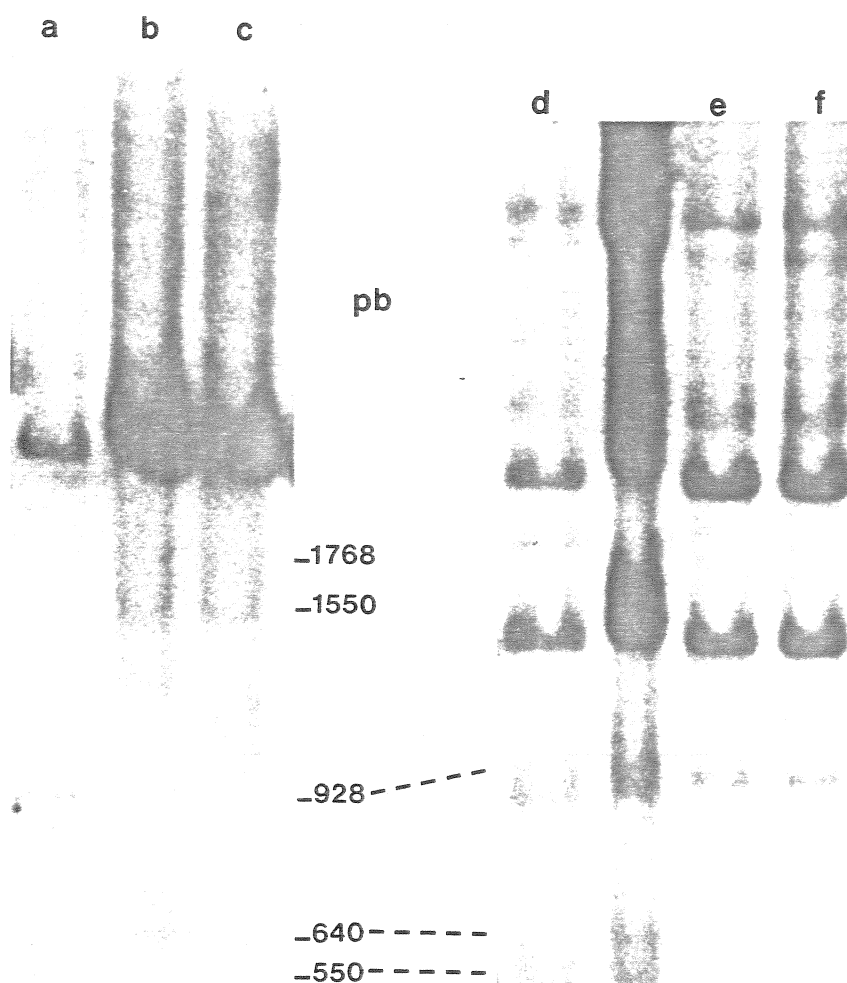


Figure 13. ANALYSE DE LA METHYLATION DANS LES LIGNEES HTF-MT /2 , dMT /2 ET LES LIGNEES REVERTANTES CORRESPONDANTES

20 µg d'ADN cellulaire ont été digérés par EcoRI et AvaI. Les fragments sont séparés sur gel d'agarose 1.2%, transférés sur nylon et hybridés avec une sonde radioactive (fragment BamHI-HindIII de pHTF-MT) contenant le HTF et T moyen.

piste a: lignée transformée HTF-MT /2
 piste b: " révertante R11
 piste c: " révertante R12
 piste d: " transformée dMT /2
 piste e: " révertante R5
 piste f: " révertante R6

le site A4 est aussi méthylé. Sur le film original, il est possible de distinguer un fragment de 1768 pb qui correspond au fragment EcorI viral non clivé. Malheureusement, la lignée transformée a perdu la partie HTF de l'insert, rendant ainsi la comparaison difficile. Nous avons obtenu un patron similaire avec 2 lignées révertantes obtenues à partir de la lignée HTFdMT/2 (figure 13, d à f). Les lignées révertantes R5 et R6 n'ont pas les fragments de 544/550 pb et de 928pb. Il y a aussi un fragment de 640 pb qui est présent. Ceci indique que les sites A4, A5 et A6 sont méthylés. Dans la lignée révertante R 12 provenant de la lignée HTF-MT/12, les fragments de 296 et 544 pb sont présents, suggérant ainsi que les sites A5 et A6 ne sont pas méthylés (Figure 14). Cependant, il y a deux nouveaux fragments de générés, un de 840 pb l'autre de 1320 pb. Puisque ces fragments n'hybrident pas avec une sonde T moyen (non illustré), alors ceux-ci originent fort probablement de la méthylation partielle de sites Ava I dans le HTF. Dans nos analyses, seule la détection de certains sites CpGs est possible soit A1, A4, A5 et A6. Il y a beaucoup d'autres CpGs dont l'Etat de méthylation ne peut être évalué par notre approche. Nous n'avons détecté aucun site méthylé parmi les 7 lignées transformées analysées. Parmi 27 lignées révertantes provenant de ces lignées et choisies au hasard, 10 n'ont pu être caractérisées à cause d'une perte complète de l'insert ou d'un signal trop faible. Dans plus de la moitié d'entre elles, nous avons retrouvé

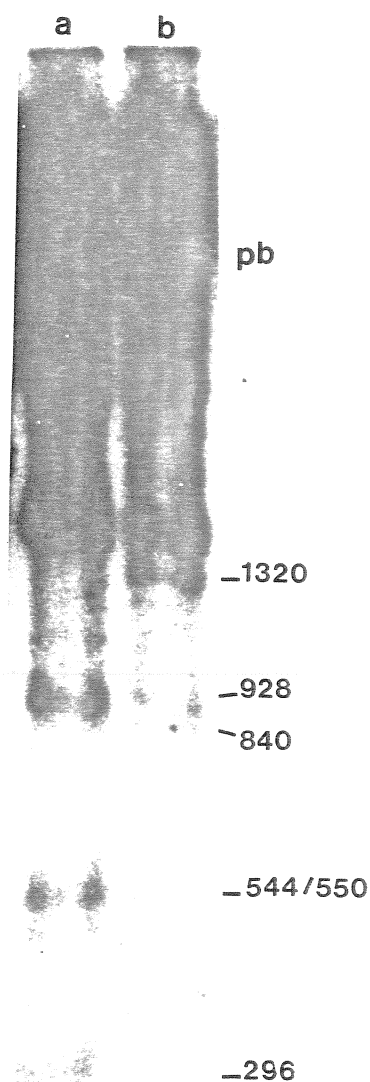


Figure 14. ANALYSE DE LA METHYLATION DANS LA LIGNEE HTF-MT/12 ET LE REVERTANT R12

20 μ g d'ADN cellulaire ont été digérés par EcoRI et AvaI. Les fragments sont séparés sur gel d'agarose 1.2%, transférés sur nylon et hybridés avec une sonde radioactive (fragment BamHI-HindIII de pHTF-MT) contenant le HTF et T moyen.

piste a: HTF-MT/12

piste b: R12

des évidences de méthylation dans le gène T moyen, dans le HTF ou dans les deux. Nous n'avons pas détecté de sites méthylés parmi seulement deux lignées révertantes. Ainsi, l'ensemble de nos résultats indiquent que le HTF n'est pas méthylé dans les lignées transformées exprimant T moyen et qu'il est partiellement méthylé dans les lignées révertantes. Nous supposons que la méthylation de certains sites CpGs est suffisante pour induire une inactivation transcriptionnelle du gène T moyen et conséquemment la réversion du phénotype.

DISCUSSION

Les résultats de ce travail indiquent que des cellules de rats, contenant l'oncogène T moyen du virus du polyome à proximité d'un îlot HTF, révertent 4 fois plus fréquemment à un phénotype normal que des cellules qui ne contiennent que l'oncogène seul. Le taux de réversion est encore plus élevé (14 fois) quand la séquence plasmidique pAT153 est cotransfectée avec le gène T moyen au lieu du HTF. La différence observée pourrait être due à la taille de l'îlot, au nombre ou encore à la nature des sites CpGs ou encore à la distance qui les sépare du gène. L'inactivation transcriptionnelle semble être le mécanisme principal causant la réversion de phénotype dans le modèle expérimental que nous avons utilisé (Bouchard et al., 1987). D'autres mécanismes peuvent cependant être aussi impliqués, comme des mutations dans le gène T moyen ou dans d'autres gènes impliqués dans le processus de transformation. On peut également considérer l'instabilité de l'ADN transfecté comme mécanisme potentiel. Une étude de Wilson et al (1986) a montré que des mutations impliquant le déplacement du cadre de lecture se produisent à une fréquence de 10⁻⁵ par cellule par génération. Il est donc probable que ces mécanismes puissent expliquer une partie des événements de réversion à faible fréquence observés dans certaines lignées. Ainsi, en tenant compte de ces autres mécanismes,

nous considérons que l'importance de l'effet des îlots HTF aurait pu être sous-estimée dans une certaine mesure.

Des séquences de régulation, baptisées "silencers" par certains, ont été mises en évidence dans la levure (Brand et al., 1985) et dans les cellules de mammifères (Laimins et al., 1986; Atweh et al., 1988). Dans la levure, la réplication semble être un événement préalable essentiel au fonctionnement du "silencer", contrairement à ce qui se passe dans les cellules phylogénétiquement plus évoluées. Ces éléments ont été identifiés en amont du gène de l'insuline 1 de rat (Laimins et al., 1986) et du gène de l'α-globine (Atweh et al., 1988). De plus, ces séquences régulatrices semblent être efficaces indépendamment de leur position et de leur orientation par rapport au gène. Il est possible d'envisager un parallèle intéressant entre les îlots HTFs et ces "silencers". Dans les deux cas, leurs effets sur la transcription ainsi que leur mode d'action semblent diamétralement opposés à ceux des enhancers. La localisation des silencers en 5' du gène de l'α-globine, une région riche en CpGs (Bird et al., 1987), appuie cette hypothèse.

Le mécanisme exact de fonctionnement des îlots HTFs ou des "silencers" reste encore à préciser. Néanmoins, il est sûrement différent de celui du modèle d'occlusion du promoteur (Adya et Gottesman, 1982) et de celui de

l'interférence de la transcription (Cullen et al., 1984), car ceux-ci impliquent une position et une orientation précises des séquences régulatrices par rapport au gène. De plus, un bon nombre d'îlots HTFs ne contiennent pas de promoteurs. Nous pouvons supposer que les îlots jouent un rôle de "silencer" en imposant des changements dans le patron de méthylation de l'ADN. D'ailleurs, plusieurs auteurs ont observé des évidences de méthylation in vivo d'îlots HTF (Compere et Palmiter, 1981) et, dans la majorité des cas, la méthylation est associée à l'inactivation du gène adjacent. A l'aide de notre système expérimental, nous avons observé que la méthylation partielle de l'îlot est suffisante pour inactiver le gène associé. Possiblement qu'il en est de même avec les HTF cellulaires endogènes, mais d'autres travaux seraient requis pour appuyer cette idée. Des travaux récents ont mis en évidence une protéine qui se lie avec le "silencer" de la levure (Diffley et Stillman, 1988) et des séquences consensus du facteur Sp1 ont été retrouvées dans des îlots HTFs (Bird et al., 1987). Le mécanisme d'action de ces facteurs face à la méthylation demeure spéculatif.

Plusieurs études indiquent que des séquences plasmidiques modulent l'expression de gènes suite à des transfections dans des cellules de mammifères (Courey et al., 1986; Peterson et al., 1987) ainsi que suite à des injections dans des animaux (Bouchard et al., 1984). Dans le cas du

plasmide pBR322, Peterson et al. (1987) ont identifié un chevauchement entre une séquence inhibitrice de l'expression des gènes et la séquence dite poison. Cette dernière est reconnue pour son interférence avec la réplication de l'ADN (Lusky et Botchan, 1981). Un autre groupe a remis en question le chevauchement avec la séquence poison (Courey et al., 1986). Jusqu'à maintenant, rien ne permet de relier directement l'effet de la réplication à l'inhibition de l'expression des gènes. D'autres travaux effectués dans notre laboratoire indiquent que pBR322 inhibe le potentiel tumorigène du virus du polyome (Bouchard et al., 1984). Lorsque la séquence poison est déléetée avant d'effectuer le même essai, on observe encore l'inhibition. Nos derniers résultats montrent maintenant qu'on obtient un effet semblable avec un îlot HTF de souris. Ainsi, le contenu élevé en CpGs, dans un plasmide ou un îlot HTF, semble jouer un rôle important dans le mécanisme d'action de l'activité "silencer".

Plusieurs chercheurs ont tenté de mettre en évidence certains sites CpGs spécifiques d'un îlot dont l'état de méthylation déterminerait préférentiellement l'expression du gène associé (Langner et al., 1986; Dobrovic et al., 1988). Par contre, d'après Murray et Grosveld (1987), le déterminant d'action d'un îlot HTF serait spécifique à une région donnée plutôt qu'attribuable à des sites précis. Malgré cette opposition qui n'est pas mutuellement exclusive

à priori, il faut considérer la nature du rôle de la méthylation dans l'inactivation de l'expression des gènes. Il peut s'agir d'un événement initiateur, ou primaire, ou encore d'un phénomène secondaire servant à imprégner de façon durable un message sur le génome. Selon Lock et al., (1987), la méthylation du gène HPRT est secondaire à une inactivation préalable du chromosome X. Encore là, ces résultats ne font pas l'unanimité. Nos résultats obtenus à partir des différents mutants de délétion du HTF suggèrent qu'un nombre minimal de sites CpGs est requis pour conserver le fonctionnement du HTF. L'analyse supplémentaire de lignées contenant d'autres mutants de délétion permettrait de distinguer l'importance relative de régions particulières en opposition à celle de sites particuliers.

Le nombre de HTF, évalué à environ 30 000 par cellule, correspond à peu près au nombre de gènes que l'on y retrouve (Bird et al., 1986). On peut facilement imaginer que la plupart des gènes pourraient être sous le contrôle d'un îlot HTF. Récemment, des chercheurs ont observé que l'activation ou l'inactivation du gène G6PD dépendait de l'état simultané de méthylation de 3 îlots HTF. Il pourrait s'agir ici d'un effet régional (Toniolo et al., 1988). Nos résultats sur l'effet de la distance entre le HTF et le gène indiquent qu'un contrôle transcriptionnel est possible à des distances de près de 1 kb, et possiblement jusqu'à 3kb dans certaines lignées. Même si la plupart des HTFs identifiés chevauchent

les premiers exons (Gardiner-Garden et Frommer, 1987), il est concevable que le contrôle d'un HTF s'étende à quelques gènes adjacents dans le génome.

Finalement, nos observations sur l'action des HTFs dans la tumorigénèse pourraient faire de la lumière sur un mécanisme d'activation d'oncogènes. On associe souvent la translocation de l'oncogène c-myc à des lymphomes de cellules B. La translocation semble provoquer une augmentation de l'expression de l'oncogène (Croce et Nowell, 1985). Le déplacement de l'oncogène à proximité de l'enhancer de la chaîne lourde des immunoglobulines demeure une hypothèse populaire, mais non sans équivoque, étant donné que la translocation peut, dans plusieurs cas provoquer simultanément la délétion de l'enhancer. Le mécanisme d'activation de c-myc demeure encore controversé. Cependant, la plupart des translocations impliquant cet oncogène entraînent un bris au niveau du premier exon ou du premier intron (Stanton et al., 1983). Suite à ce bris, la plupart des sites HpaII qui sont regroupés dans cette région sont éliminés lors de la translocation (Colby et al., 1983). De plus, la translocation sépare c-myc d'un îlot HTF en amont contenant 26 sites HpaII à l'intérieur de 2.3 kb d'ADN (Cazin et al., 1984). Nous émettons donc l'hypothèse que l'activation transcriptionnelle du gène c-myc résulte de la séparation du gène de son îlot HTF suite à la translocation.

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier le Dr Marcel Bastin, mon directeur de maîtrise, pour les conseils, les idées originales ainsi que pour l'excellent soutien qu'il m'a offert tout au long de ce projet.

Je tiens à remercier spécialement Mme Johanne Toutant pour sa précieuse collaboration à la culture de cellules. J'aimerais aussi souligner la généreuse contribution de M. Benoit Robitaille pour la conception de plusieurs figures ainsi que celle du Dr Mongeau pour l'analyse histopathologique des tumeurs

J'aimerais aussi remercier toutes les personnes qui m'ont entouré pendant ce travail:

- Carole Bergeron, Louise Bouchard, Jean-Claude Chaîné, Angèle Larose, Sylvette Laurent, Céline Pinsonneault, Luc St-Onge et Annyck Ratiarson, pour leur appui, leurs conseils et l'excellent climat de travail qu'ils ont su créer.

Enfin, je remercie le Fonds de la Recherche en Santé du Québec pour son support financier. Et finalement, je souligne le support de mon amie Caroline Gaudet qui a su me motiver tout au long de ce travail.

REFERENCES

- Adhya, S. et M. Gottesman. (1982). Promoter occlusion: Transcription through a promoter may inhibit its activity. *Cell* 29: 939-944.
- Asselin, C., C. Gelinas et M. Bastin. (1983). Role of the three polyoma virus early proteins in tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* 3: 1451-1459.
- Atweh, G.F., J.M. Liu, H.E. Brickner et X.X. Zhu. (1988). A silencer like element from the α -globin gene inhibits expression of beta like gene. *Mol. Cell. Biol.* 8: 5047-5051.
- Bastin, M., D. Bourgaux-Ramoisy et P. Bourgaux. (1980). Biological properties of polyoma DNA fragments cloned in pBR322 fragments. *J. Gen. Virol.* 50: 179-184.
- Bird, A.P. et E.M. Southern. (1978). Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. *J. Mol. Biol.* 118: 27-47.
- Bird, A.P. (1980). DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 1499-1504.
- Bird, A.P., M. Taggart, M. Frommer, O.J. Miller et D. Macleod. (1985). A fraction of the mouse genome that is derived from islands of non-methylated, CpG rich DNA. *Cell* 40: 91-99.
- Bird, A.P. (1986). CpG rich-islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321: 209-213.
- Bird, A.P., M.H. Taggart, R.D. Nicholls et D.R. Riggs. (1987). Non-methylated CpG-rich islands at the human α -globin locus: implication for evolution of the α -globin pseudogene. *EMBO J.* 6: 999-1004.
- Borrello, M.G., M.A. Pierotti, I. Bongarzone, R. Donghi, P. Mondellini et G. Della porta. (1987). DNA methylation affecting the transforming activity of the human Ha-ras oncogene. *Canc. Res.* 47: 75-79.
- Bouchard, L., C. Gélinas, C. Asselin et M. Bastin. (1984). Tumorigenic activity of polyoma virus and SV40 DNAs in newborn rodents. *Virology* 135: 53-64.
- Bouchard, L., J. Vass-Marengo et M. Bastin. (1986). Expression of the malignant phenotype in rat fibroblasts transfected with polyomavirus transforming gene. *Virology* 155: 1-12.

- Bouchard, L., F. Mathieu et M. Bastin. (1987). High frequency changes in transcriptional activity in polyomavirus-transformed cell lines. *J. Virol.* 146: 2448-2453.
- Boyer, H.W. et D. Rouillard-Dussoix. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.
- Brand, A.H., L. Breeden, J. Abraham, R. Sternglanz et K. Nasmyth. (1985). Characterisation of a "silencer" in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell.* 41: 41-48.
- Brown, W.R.A. et A.P. Bird. (1986). Long range restriction site mapping of mammalian genomic DNA. *Nature* 322: 477-481.
- Calos, M.P., J. S. Lebrowski et M.R. Bolchan. (1983). High mutation frequency in DNA transfected into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3015-3019.
- Cazin, C., S. Dupont de Dinechin, J.-M. Masson, P. Martin, D. Stehelin et F. Galibert. (1984). Nucleotide sequence of the human c-myc locus: Provocative open reading frame within the first exon. *EMBO J.* 3: 383-387
- Chada, K., J. Magnam, K. Raphael, G. Radice, E. Lacy et F. Costantini. (1985). Specific expression of a foreign B-globin gene in erythroid cells of transgenic mice. *Nature* 314: 377-380.
- Colby, W.W., E.Y. Chen, D.H. Smith et A.D. Levinson. (1983). Identification and nucleotide sequence of a human locus homologous to the v-myc oncogene of avian myelocytomatosis virus MC29. *Nature* 301: 722-725.
- Compere, S.J. et R.D. Palmiter. (1981). DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein I gene in lymphoid cells. *Cell* 25: 233-240.
- Cooper, D.N., M.H. Taggart et A.P. Bird. (1983). Unmethylated domains in vertebrate. *Nucleic Acids. Res.* 11: 647-658.
- Corden, J., B. Wasybyk, A. Buchinalder, D. Sassone-Corsi, D. Keding et P. Chambon. (1980). Promotor sequences of eukaryotic proteins genes. *Science* 209: 1406-1413.
- Coulondre, C., J.H. Miller, P.J. Farabaugh et W. Gilbert. (1978). Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 174: 775-780.

- Courey, A.J., S.E. Plon et J.C. Wang. (1986). The use of psoralen- modified DNA to probe the mechanism of enhancer action. *Cell*. 45: 567-574.
- Croce, C.M. et P.C. Nowell. (1985). Molecular basis of human B cell neoplasia. *Blood* 65: 1-7.
- Cullen, B.R., P.T. Lomedico et G. Ju. (1984). Transcriptional interference in avian retroviruses - implication for the promoter insertion model of leukaemogenesis. *Nature*. 307: 241-245.
- Davies, M.M., K. Calanne, P.W. Early, D.L. Livant, R. Joho, I.L. Weissman et L.Hood. (1980). An immunoglobulin heavy chain gene is formed by at least two recombinational events. *Nature* 283: 733-739.
- Diffley, J.F. et B. Stillman. (1988). Purification of a yeast protein that binds to origin of replication and a transcriptional silencer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2120-2124.
- Dobrovic, A., J.L. Pierre Gareau, G. Ouellette et W.E.C Bradley. (1988). DNA methylation and genetic inactivation at thymidine kinase locus: two different mechanisms for silencing autosomal genes. *Somatic Cell and Mol. Gen.* 14: 55-68.
- Dudov, M.K. et R.P. Perry. (1984). The gene family encoding the mouse ribosomal protein L32 contains a uniquely expressed introncontaining gene and an unmutated processed gene. *Cell* 37: 457-468.
- Dush, M.K., J.M. Sikela, S.A. Khan, J.A. Tischfield et P.D. Stambrook. (1985). Nucleotide sequence and organisation of the mouse adenine phosphoribosyltransferase gene: presence of a coding region common to animal and bacterial phosphoribosyltransferases that has a variable intron/exon arrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2731-2735.
- Emerman, M. et H.M. Temin. (1984). Genes with promoters in retrovirus vectors can be independently suppressed by an epigenetic mechanism. *Cell*. 39: 459-467.
- Feinberg, A.P. et B. Vogelstein. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
- Feinberg, A.P. et B. Vogelstein. (1984). ADDENDUM. *Anal. Biochem.* 137, 266-267
- Fischel-Ghodsian, N., R.D. Nicholls et D.R. Higgs. (1987).

Unusual features of CpG rich (HTF) islands in the human α -globin complex: association with non-functional pseudogenes and presence within the 3' portion of the e-gene. *Nucleic Acids Res.* 15: 9215-9225.

Fried, M., B.E. Griffin, E. Lund et D.L. Robberson. (1974). Polyomavirus - a study of wild type, mutant and defective DNAs. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39: 45-52.

Gardiner-Garden, M. et M. Frommer. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* 196: 261-282.

Gélinas, C., L. Bouchard et M. Bastin. (1981). Tumorigenic activity of cloned polyoma virus DNA in newborn rats. *Experientia* 37: 1074-1075.

Gélinas, C. et M. Bastin. (1985). Malignant transformation of rat cells by the polyomavirus middle T gene. *Virology* 146: 233-245.

Graessman, M., A. Graessman, H. Wagner, E. Werner et D. Simon. (1983). Complete DNA methylation does not prevent polyoma and simian virus 40 early gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6470-6474.

Gruenbaum, Y., R. Stein, H. Cedar et A. Razin. (1981). Methylation of CpG sequences in eukariotic DNA. *FEBS Lett.* 124: 67-71.

Israel, M.A., H.W. Chan, S.L. Hourihan, W.P. Rowe et M.A. Martin. (1979a). Biological activity of polyoma viral DNA in mice and hamsters. *J. Virol.* 29: 990-996.

Israel, M.A., D.T. Simmons, S.L. Hourihan, W.P. Rowe et M.A. Martin. (1979b). Interrupting the early region of polyoma DNA enhances tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3713-3716.

JeanPierre, M. (1987). A rapid method for the purification of DNA from Blood. *Nucleic Acids Res.* 15: 9611.

Keshet, I., J. Yisraeli et H. Cedar. (1985). Effect of regional DNA methylation on gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2560-2564.

Khoury, G. et P. Gruss. (1983). Enhancer elements. *Cell* 33: 313-314.

Klobutcher, L.A., C.L. Miller et F.H. Ruddle. (1980). Chromosome-mediated gene transfer results in two classes of unstable transformants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3610-3614.

- Kunnath, L. et J. Locker. (1982). Characterisation of DNA methylation in the rat. *Biochem. Biophys. Acta.* 699: 264-271.
- Laimins, L., M. Holmgren-Konig et G. Khoury. (1986). Transcriptional "silencer" element in rat repetitive sequences associated with rat insulin 1 gene locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 3151-3155.
- Langner, K.D., U. Weyer et W. Doerfler. (1986). Trans effect of the E1 region of adenoviruses on the expression of a prokaryotic gene in mammalian cells: Resistance to 5'-CCGG-3' methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1598-1602.
- Lock, L.F., N. Takagi et G.R. Martin. (1987). Methylation of the HPRT gene on the inactive X occurs after chromosome inactivation. *Cell* 48: 39-46.
- Luria, S.E. et M. Delbrück. (1943). Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28: 491-511.
- Lusky, M. et M. Botchan. (1981). Inhibition of SV40 replication in simian cells by specific pBR322 DNA sequences. *Nature.* 293: 79-84.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. et J. Sambrook. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor laboratory. (1982).
- Mathey-Prevost, B., M. Shibuya, J. Samarut et H. Hanafusa. (1984). Revertants and partial transformants of rat fibroblasts infected with fujinami sarcoma virus. *J. Virol.* 50: 325-334.
- Murray, E.J. et F. Grosveld. (1987). Site specific demethylation in the promoter of human α -globin gene does not alleviate methylation mediated suppression. *EMBO J.* 6: 2329-2335.
- Peterson, D.O., K.K. Beifuss et K.L. Morley. (1987). Context-dependent gene expression: cis acting negative effects of specific procaryotic plasmid sequences on eucaryotic gene. *Mol. Cell. Biol.* 7: 563-1567
- Quint, A. et H. Cedar. (1981). In vitro methylation with HpaII methylases. *Nucleic Acids Res.* 9: 633-646.
- Razzaque, A., H. Mizusawa et M.M. Seidman. (1983). Rearrangement and mutagenesis of a shuttle vector plasmid after passage in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3010-3014.

- Roginski, R.S., A.I. Skoultschi, P. Henthorn, O. Smithies, N. Hsiung et R. Kucherlapati. (1983). Coordinate modulation of transfected HSV thymidine kinase and human globin genes. *Cell* 35: 149-155.
- Russell, G.J., P.M.B. Walker, R.A. Elton et J.H. Subak-Sharpe. (1976). Doublet frequency analysis of fractionated vertebrate nuclear DNA. *J. Molec. Biol.* 108: 1-23.
- Scangos, G.A., K.M. Huttner, S. Silverstein et F.H. Ruddle. (1979). Molecular analysis of chromosome mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3987-3990.
- Scangos, G. et F. Ruddle. (1981). Mechanisms and applications of DNA mediated gene transfer in mammalian cells. *Gene* 14: 1-10.
- Seif, R. et F. Cuzin. (1977). Temperature-sensitive growth regulation in one type of transformed rat cells induced the tsa mutant of polyoma virus. *J. Virol.* 24: 721-728.
- Siegel, S., *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*, McGraw Hill. (1956)
- Siminovitch, L. (1976). On the nature of heritable variation in cultured somatic cells. *Cell* 7: 1-11.
- Smith, H.O. et M.L. Birnsteil. (1976). A simple method for DNA restriction site mapping. *Nucleic Acids Res.* 3: 2387-2398.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-515.
- Stanton, L.W., R. Watt et K.B. Marcu. (1983). Translocation, breakage and truncated transcripts of a c-myc oncogene in murine plasmacytomas. *Nature* 303: 401-406.
- Stein, R., N. Scraky-Gallili, A. Razin, et H. Cedar. (1983). Pattern of methylation of two genes coding for housekeeping functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2423-2426.
- Stow, N.D. et Wilkie, N.M. (1976). An improved technique for obtaining enhanced infectivity with Herpes simplex virus DNA. *J. Gen. Virol.* 33: 447-458.
- Swartz, M.N., T.A. Trautner et A. Kornberg. (1962). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acids XI: Further studies on nearest neighbor base sequences in deoxyribonucleic acids. *J. Biol. Chem.* 237: 1961-1967.

- Toniolo, D., M. D'Urso, G. Martini, M. Persico, V. Tufano, G. Battistuzzi et L. Luzzato. (1984). EMBO J. 3: 1987-1995.
- Toniolo, D., G. Martini, B.R. Migeon et R. Dono. (1988). Expression of the G6PD locus on the human X chromosome is associated with demethylation of three CpG islands within 100 kb of DNA. EMBO J. 7: 401-406.
- Treisman, R., U. Novak, J. Favaro et R. Kamen. (1981). Transformation of rat cells by an altered polyoma virus genome expressing only the middle T protein. Nature 292: 595-600.
- Townes, T.M., J.B. Lingrel, H.Y. Chen, R.L. Brinster et R.D. Palmiter. (1985). Erythroid-specific expression of human B-globin genes in transgenic mice. EMBO J. 4: 1715-1723.
- Van der Ploeg, L.H.T. et R.A. Flavell. (1980). DNA methylation in the human α -globin locus in erythroid and non erythroid tissues. Cell 19: 947-958.
- Vieira, J. et J. Messing. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with universal primer. Gene 19: 259-268.
- Wigler, M., S. Silverstein, L.S. Lee, A. Pellicer, Y.C. Cheng et R. Axel. (1977). Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. Cell 11: 223-232.
- Wigler, M., R. Sweet, G.K. Sim, B. Wold, A. Pellicer, R. Axel et S. Silverstein. (1979). Transformation of mammalian cells with genes from prokaryotes and eukaryotes. Cell 16: 777-785.
- Wilson, J.B., A. Hayday, S. Courtneidge et M. Fried. (1986). A frameshift at a mutational hotspot in the polyoma virus early region generates two new proteins that define T-antigen functional domain. Cell. 44: 477-487.
- Wolf, S.F., D.J. Jolly, K.D. Lunnen, T. Friedman et B.R. Migeon. (1984a). Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X chromosome: implication for X chromosome inactivation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 2806-2810.
- Wolf, S.F., S. Dintzis, D. Toniolo, G. Persico, K.D. Lunnen, J. Axelmann et B.R. Migeon. (1984b). Complete concordance between glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and hypomethylation of CpG clusters:

Implication for X chromosome dosage compensation.
Nucleic Acids Res. 12: 9333-9348.

Yen, P.H. P. Patel, A.C. Chinault, T. Mohandas et L. J. Shapiro. (1984). Differential methylation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase genes on active and inactive X chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1759-1763.

Youssaf, S.I., A.R. Carroll et B.E. Clarke. (1984). A new and improved method for 3'-end labelling DNA using α - ^{32}P dd ATP. Gene 27: 309-313.

ANNEXE A

EQUATION DECRIVANT LA PERTE DE L'INSERT DANS LES LIGNEES
REVERTANTES pHTF-MT

-Pour décrire la variation du nombre d'individus dans une population en fonction du temps, on a de façon générale:

$$\frac{dN}{dt} = KN \quad (1)$$

où N = nombre d'individus dans une population
 N_0 = " " " " "
 au temps zéro
 t = temps
 K = constante

-En intégrant (1) de N_0 à N, on obtient:

$$N = N_0 e^{Kt} \quad (2)$$

-La relation entre n, le nombre de générations, et N est:

$$N = 2^n \quad (3)$$

-En combinant (2) et (3), il résulte que:

$$\frac{n}{t} = \frac{K}{\ln 2} \quad (4)$$

-On peut poser 2 équations différentielles décrivant la variation des populations cellulaires, avec et sans insert, dans le temps:

$$\frac{dG}{dt} = k_1 G - pK_1 G \quad (5)$$

et

$$\frac{dP}{dt} = pK_1 G + k_2 P \quad (6)$$

où G = nombre de cellules qui ont gardé l'insert
 P = " " " " " perdu "
 p = proportion de cellules qui perdent l'insert à chaque génération
 k_1 et k_2 sont les constantes de vitesses de croissance respectives

-Nous définissons :

93

$$F = \frac{G}{G + P} \quad (6a)$$

-Les équations (5) et (6) permettent de définir G et P en fonction du temps. Il faut résoudre ce système d'équations différentielles pour évaluer F, qui représente la proportion de cellules qui ont l'insert à un moment précis.

-On peut résoudre (5) en intégrant de G_0 à G:

$$(\ln G) = (1 - p) k_1 t$$

d'où

$$G = G_0 e^{(1 - p) k_1 t} \quad (7)$$

-En remplaçant G dans (6):

$$\frac{dP}{dt} = p k_1 G_0 e^{(1 - p) k_1 t} + k_2 P \quad (8)$$

-Puisqu' à $t = 0$, le premier terme s'annule:

$$\frac{dP}{P} = k_2 dt \quad (9)$$

-En intégrant (9) entre P_0 et P, on a:

$$P = P_0 e^{k_2 t} \quad (10)$$

-ensuite, on évalue (6) entre P_0 et P:

$$\frac{dP}{dt} e^{k_2 t} + k_2 P_0 e^{k_2 t} - k_2 P_0 e^{k_2 t} = p k_1 G_0 e^{(1 - p) k_1 t} \quad (11)$$

-En simplifiant, on obtient:

$$P_0 = \frac{p k_1 G_0 e^{((1 - p) k_1 - k_2) t}}{(1 - p) k_1 - k_2} + Cte \quad (12)$$

$$(1 - p) k_1 - k_2$$

où Cte est une constante

-on pose la condition suivante pour isoler la constante:

$$t = 0, G = G_0 \text{ et } P = P_0$$

-Alors on obtient la solution particulière:

$$P_0 = \frac{p k_1 G_0}{(1-p) k_1 - k_2} + Cte \quad \text{où} \quad Cte = P_0 - \frac{p k_1 G_0}{(1-p) k_1 - k_2} \quad (13)$$

-En remplaçant dans (10), on a la solution générale:

$$P = P_0 e^{k_2 t} + \frac{p k_1 G_0}{(1-p) k_1 - k_2} \times (e^{(1-p) k_1 t} - e^{k_2 t}) \quad (14)$$

-Connaissant maintenant G et P, il est possible de reformuler le postulat de départ

$$F = \frac{G}{G + P} \quad (6a)$$

-En remplaçant à l'aide de (7) et (14) et en simplifiant:

$$F = \frac{e^{(1-p) k_1 t}}{e^{(1-p) k_1 t} + \frac{p k_1}{(1-p) k_1 - k_2} \times (e^{(1-p) k_1 t} - e^{k_2 t})} \quad (15)$$

-Selon (4), $k_1 t = n \ln 2$, et si l'on pose $\frac{k_2}{k_1} = \alpha$

l'équation (15) devient après simplification:

$$F(n) = \frac{1 - p - \alpha}{1 - \alpha - p 2^{n(\alpha + p - 1)}} \quad (16)$$

-Si l'on suppose que les cellules révertantes avec ou sans insert ont la même dynamique de croissance, on peut dire que:

$$k_1 = k_2 \quad \text{et} \quad \alpha = 1$$

-Et on obtient l'équation finale:

$$F_{(n)} = \frac{1}{2np}$$

EXEMPLE DE CALCUL:

(Lignée pHTF-MT /1 R1)

$F = 0.2$, $n = 31$ ainsi $p = 2 \times 10^{-1}$